

CARYOLOGIA

Giornale di Citologia, Citosistemica e Genetica
Journal of Cytology, Cytosystematics and Genetics

Fondato
da
ALBERTO CHIARUGI



Editore e Direttore:
EMILIA MESSERI CHIARUGI

Condirettore resp. e Redattore:
FERNANDO FABBRI

Comitato di consulenza scientifica:

EMILIO BATTAGLIA
MARIO BENAZZI
VINCENZO CHIARUGI
GIUSEPPE COLOSI
ROBERTO CORTI

FRANCESCO D'AMATO
ELEONORA FRANCINI CORTI
GIUSEPPE MARTINOLI
ALBINA MESSERI
EMANUELE PADOA

RODOLFO PICHI-SERMOLLI

Maggio - Agosto 1961

VOLUME 14 - NUMERO 2

NUOVI DATI SULL'ATTIVITÀ MUTAGENA DELL'ARANCIO DI ACRIDINA IN *ALLIUM CEPA* L.

VITTORIA NUTI RONCHI

Istituto di Genetica dell'Università, Pisa

In Redazione: il 10 Luglio 1961*

INTRODUZIONE

L'azione mutagena degli acridinici, dimostrata per la prima volta con la acriflavina su *Escherichia coli* (WITKIN 1947), su *Drosophila* (DEMEREK 1949) e sui lieviti (EPHRUSI 1949), è stata oggetto di un approfondito studio da parte di D'AMATO (1950) sul test *Allium*. Fra i molti derivati acridinici studiati, l'arancio di acridina, essendo facilmente solubile in acqua e scarsamente tossico, aveva manifestato un effetto mutageno molto intenso in una vasta scala di concentrazioni.

Le esperienze di D'AMATO, eseguite in condizioni di illuminazione diurna naturale, non prendevano in esame le possibili conseguenze di un'azione fotodinamica dell'arancio di acridina. Gli acridinici, infatti, come molti altri coloranti organici, sono sostanze fotodinamiche che funzionano da sensibilizzatori, provocando, per assorbimento della luce in presenza di ossigeno, un'ossidazione fotodinamica della materia organica che si risolve con un effetto inibitore o anche letale sugli organismi viventi. Azione mutagena in presenza di luce da parte dell'eosina e eritrosina è stata dimostrata, su microrganismi, da DÖRING (1938) e da KAPLAN (1948), mentre le ricerche della PATTERSON (1942) con il rosso neutro attivato dalla luce solare avevano messo in evidenza soltanto agglutinazione cromosomica nelle mitosi di apici radicali di orzo. I coloranti usati in queste esperienze (eosina, eritrosina, rosso neutro) si differenziano dagli acridinici quanto ad affinità con i costituenti del nucleo cellulare. Sono numerose, infatti, le ricerche che hanno messo in evidenza l'esistenza di un rapporto diretto fra acidi nucleinici e acridina e derivati. Questi studi, che risalgono alle prime ipotesi dovute al FEULGEN (1913) sulla formazione di sali fra acidi nucleinici e coloranti, hanno dimostrato, con i lavori di MC ILWAIN (1941) sull'azione della tripaflavina e della proflavina sui batteri e dei LETTRÉ (1947) e di BAUCH (1949) su tessuti animali e radici di cipolla rispettivamente, che esiste un antagonismo fra acidi nucleici e derivati acridinici, fondato appunto sulla formazione di sali complessi. Sia i LETTRÉ che BAUCH hanno, infatti, provato che era sufficiente l'aggiunta, nel

* Lavoro eseguito con un Contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato Nazionale per l'Agricoltura e la Zootecnica.

mezzo nutritizio (per le colture in vitro di tessuti animali) o direttamente alla soluzione del colorante (nel caso di meristemi radicali di cipolla), di una adeguata quantità di acido nucleinico per impedire l'avvelenamento della mitosi da parte del colorante. Questa quantità è, nel caso della tripaflavina, di 1:250 in peso; ciò che indicherebbe che una molecola di tripaflavina viene compensata da circa una molecola di acido nucleinico.

Lavori più recenti hanno cercato di individuare questa affinità fra acridinici e acidi nucleinici. Studi spettrofotometrici di MORTLAND, DE BRUYN e SMITH (1954) e di BEERS, HENDLEY e STEINER (1958) hanno dimostrato la formazione di complessi acridinici-acidi nucleinici, legati più che da una semplice attrazione elettrostatica, probabilmente da un legame mediato da un gruppo fosfatico dell'acido nucleico, e hanno provato che il colorante è maggiormente legato al DNA che al RNA. Il grado di polimerizzazione del DNA ha un marcato effetto sulla formazione di questo complesso; il che può far pensare che la depolimerizzazione distrugga delle regioni nella molecola dell'acido nucleico che sarebbero spazialmente favorevoli alla formazione del complesso. In particolare, l'affinità dell'arancio di acridina per gli acidi nucleici è stata studiata su tessuti animali da ARMSTRONG (1956). Basandosi su queste proprietà, KIHLMAN (1959) ha preso in esame l'effetto della luce sulla struttura cromosomica di cellule di apici radicali di *Vicia faba*, trattati in precedenza con arancio di acridina, ritenendo che, per indurre modificazioni nel materiale genetico, la luce doveva essere assorbita da molecole del colorante legato all'acido desossiribonucleico dei cromosomi. In queste esperienze, l'arancio di acridina si è dimostrato attivo come mutageno alla concentrazione di $3,5 - 5 \times 10^{-6} \text{ M/l}$ quando le radici, dopo il trattamento con la soluzione per 20 ore, erano illuminate per 40'-60' in una soluzione tampone fosfatica M/150 in presenza di ossigeno (20 e 100% nella fase gassosa). L'arancio di acridina, in assenza di luce, era inattivo su *Vicia faba*. Sulla base di questi risultati, KIHLMANN ha suggerito che l'effetto mutageno dell'arancio di acridina riscontrato da D'AMATO su *Allium* fosse dovuto alla capacità dell'arancio di acridina di agire come fotosensibilizzatore. In relazione alle esperienze condotte da KIHLMAN è apparsa, pertanto, necessaria una reinvestigazione per stabilire fino a qual punto l'effetto mutageno dell'arancio di acridina sia da attribuire all'azione fotodinamica del colorante per i due tests *Vicia faba* e *Allium cepa*. Una nota preliminare sull'argomento è stata pubblicata recentemente (NUTI RONCHI e D'AMATO 1961).

MATERIALI E METODI

Si impiegarono bulbi di cipolla della varietà « Fiorentina » con radici in rapida crescita (3-5 cm. all'atto del trattamento) e semi germinati di una varietà italiana di *Vicia faba*, in cui, per decapitazione della radice principale, veniva stimolata l'emissione di radici laterali (1-2 cm all'atto del trattamento).

I trattamenti, eseguiti in provettoni di vetro della capacità di 80 cc e alla temperatura di 18° C, furono i seguenti:

1) trattamenti al buio, con soluzioni di arancio di acridina (in acqua di fonte), preparate all'istante, da 100 a 5 ppm ($370-18,5 \times 10^{-6}$ M/l) per 4 ore o 24 ore, seguiti da trasferimento in acqua di fonte (ripresa), sempre al buio. Controlli citologici periodici venivano eseguiti fino alla completa ripresa della mitosi;

2) trattamenti al buio, con le stesse concentrazioni di arancio di acridina e stessa durata di cui ad 1), seguiti da post-trattamento in soluzioni di acido nucleinico da lievito (Merck) contenenti quantità in peso di 250 volte quella della soluzione di arancio di acridina usata e portate a pH 6,2 con aggiunta di bicarbonato sodico, nel tentativo di ridurre l'effetto tossico di accumulo (BAUCH 1949) del colorante nel materiale genetico. Successivamente al post-trattamento con acido nucleinico, della durata di 6 ore, e al trasferimento delle radici in acqua di fonte (ripresa al buio) si eseguivano controlli citologici periodici fino alla completa ripresa della mitosi;

3) trattamenti in presenza di luce e ossigeno. Fu messa a punto la tecnica adottata dal KIHLMAN con la quale si è riusciti a riprodurre, su radici laterali di semi germinati di *Vicia*, risultati comparabili, in tipi e frequenze di modificazioni strutturali cromosomiche, a quelli da lui riportati.

Nei trattamenti alla luce furono adoperate una soluzione in acqua di fonte di arancio di acridina di $1,15 \times 10^{-6}$ M/l (0,31 ppm) e concentrazioni minori, essendosi notato che concentrazioni maggiori avevano effetto letale. Dopo trattamento nella soluzione per 24 ore e lavaggio in acqua di fonte per 2-3 ore, i bulbi venivano trasferiti per l'illuminazione in una scatola a tenuta d'aria di « Lucite » delle dimensioni di $7 \times 14 \times 18$ cm contenente una soluzione tampone fosfatica M/150 e illuminata per 40' da due parti con lampade Philips « Attralux » tipo 13378 R/44 da 24 V e 150 W. Per impedire l'aumento di temperatura durante il periodo di illuminazione, la scatola di « Lucite » era immersa in acqua corrente; ciò che permetteva di mantenere la temperatura della soluzione tampone a 15-16° C. Fra le lampade e le radici c'erano 10 cm d'aria, 1 cm di « Lucite », 5 cm di soluzione tampone. Durante l'illuminazione ossigeno puro o aria erano fatti gorgogliare attraverso un tubo di plastica che, attraversando il coperchio a chiusura ermetica della scatola di « Lucite », pescava nella soluzione tampone, sul fondo della scatola stessa. Dopo il trattamento alla luce, i bulbi venivano trasferiti in acqua di fonte per un periodo di ripresa al buio e a 18° C e i controlli citologici eseguiti ogni 24 ore.

L'analisi citologica fu condotta secondo la tecnica dello « striscio al Feulgen » (D'AMATO 1946) dopo fissazione in miscela alcool-acetica 3:1, con lo studio delle sole anafasi medie e finali, escludendo le poche anafasi « polverizzate » (cfr. D'AMATO 1950) presenti nei singoli trattamenti. Tutte le aberrazioni furono calcolate in termini di rotture cromosomiche (B'') e cromatidiche (B').

RISULTATI

1) *Effetto citologico dell'arancio di acridina nei trattamenti al buio.*

Il periodo privo di mitosi variava, a seconda delle concentrazioni usate, rivelando all'esame citologico la presenza di « profasi avvelenate » in lenta despiralizzazione (D'AMATO 1950). Con la concentrazione di 100 ppm ($370 \times 10^{-6} \text{M/l}$) erano sufficienti 4 ore di trattamento per arrestare le mitosi per 6-7 giorni, mentre per tutte le altre concentrazioni un trattamento di 24 ore permetteva la ripresa dopo un periodo variabile da 7 a 2 giorni (Tab. I). Nella ripresa, pur permanendo un « effetto fisiologico » in alcune anafasi sotto forma di ponti « sticky », le anafasi aberranti erano numerose (da 50 a 17%), e notevole la quantità riscontrabile di micronuclei, talvolta anche 3 e più per cellula. Fra le aberrazioni più comuni erano i frammenti cromosomici (doppi) liberi nel citoplasma, ma non rare erano le traslocazioni (indicate dalla presenza di dicentrici e anelli centrici e acentrici), come si rileva dall'indice di « rearrangement ». I frammenti cromatidici si presentavano non molto frequenti, e in molti casi erano probabilmente dovuti a rotture parziali rese complete sotto le forze di tensione in atto durante i movimenti cromosomici dalla metafase all'ana-telofase (D'AMATO 1950). In altri casi la rottura permaneva incompleta anche nella fase finale dell'anafase, dando luogo alle rotture indicate come B « partial » nella Tabella I, cioè frammenti che rimangono legati al corpo cromosomico, attraverso una più o meno profonda « erosione ». Pochi casi di rotture parziali erano presenti sotto forma di « pseudochiasmi » dovuti a rottura e riunione a livello sub-cromatidico (D'AMATO e D'AMATO AVANZI 1954).

2) *Azione dell'acido ribonucleico da lievito sull'effetto citologico dell'arancio di acridina.*

Come risulta dalla Tabella II, il post-trattamento con acido ribonucleico non ha risposto in maniera univoca rispetto al periodo privo di mitosi, nelle varie concentrazioni provate. Infatti, mentre per le concentrazioni più forti ($370-92,5 \times 10^{-6} \text{M/l}$) le radici sottoposte all'azione dell'acido ribonucleico riprendevano dopo un periodo privo di mitosi minore anche di 3-4 giorni rispetto a quelle trattate con solo arancio di acridina, nelle concentrazioni minori ($74-18,5 \times 10^{-6} \text{M/l}$) avveniva perfettamente il contrario. È probabile che le concentrazioni di compenso usate (250 volte in peso di acido ribonucleico rispetto alla soluzione di arancio di acridina impiegata), pur essendo efficaci per le dosi maggiori, non lo fossero per le dosi minori di arancio di acridina, per le quali si sarebbero dovute trovare concentrazioni di compenso più idonee. È, però, da notare che l'indice mitotico era sempre più alto nella ripresa delle radici che avevano subito il post-trattamento, indicando che l'aggiunta dell'acido nucleico

aveva ridotto in parte l'effetto tossico di accumulo, permettendo una più completa ripresa mitotica nel meristema. La percentuale di anafasi aberranti e il tipo di modificazioni strutturali cromosomiche non differivano sostanzialmente da quelle provocate dal solo arancio di acridina.

3) Azione della luce sull'effetto citologico dell'arancio di acridina.

La sola concentrazione di $1,15 \times 10^{-6}$ M/l dava luogo a modificazioni strutturali nella ripresa dopo illuminazione per 40' in presenza di ossigeno puro. Il periodo privo di mitosi, della durata di 3 giorni, non presentava, come nei trattamenti con solo arancio di acridina, profasi avvelenate in despiralizzazione, ma si aveva un tipico « vuoto mitotico ». La percentuale di anafasi aberranti era di 22,15% nella ripresa, ma è da notare che una parte delle radici non riprendeva per differenziazione dell'apice. All'analisi citologica si riscontravano frammenti cromosomici e cromatidici e un certo numero di traslocazioni. Il trattamento eseguito su radici laterali di semi germinati di *Vicia*, con la concentrazione usata da KIHLMAN (1959), ha fornito una percentuale di modificazioni strutturali paragonabili a quelle da lui ottenute e precisamente: 20% di anafasi aberranti, con — in media — 22% di modificazioni strutturali. Pertanto, la percentuale di anafasi aberranti si avvicina molto a quella riscontrata in *Allium*, ma la concentrazione di arancio di acridina necessaria per ottenere effetto mutageno in *Allium* è notevolmente inferiore a quella efficace in *Vicia*. Inoltre, mentre per *Vicia* i frammenti, sempre cromatidici, si rilevavano sempre dopo 24 ore di ripresa, in *Allium* la ripresa avveniva sempre dopo un periodo privo di mitosi più o meno lungo. Inoltre in *Allium* periodi privi di mitosi si riscontravano anche in concentrazioni molto diluite, (fino a $0,07 \times 10^{-6}$ M/l), anche se la ripresa non rivelava casi di modificazioni strutturali nei cromosomi (Tab. III).

DISCUSSIONE

La presente ricerca mostra, per il test *Allium*, una azione mutagenica dell'arancio di acridina indipendente dalla luce, confermando per tipi e frequenza di aberrazioni cromosomiche i dati forniti da D'AMATO (1950). Anche il valore-limite del potere mito-inibitore dell'arancio di acridina, indicato da D'AMATO intorno a 10 mgr/l, è nei trattamenti precedentemente illustrati poco al disotto di tale concentrazione (Tab. II). Siccome le stesse concentrazioni risultano, dalle prove di KIHLMAN, confermate anche da nostri esperimenti, del tutto inattive come mutagene in radici di *Vicia* al buio, appare chiaro che i due test, *Allium* e *Vicia*, rispondono in modo del tutto diverso all'azione dell'arancio di acridina.

La Tabella II dimostra che su *Allium* l'arancio di acridina agisce anche come fotosensibilizzatore in presenza di luce e di ossigeno. Inoltre, la ripetizione, su semi germinati di *Vicia*, dei dati forniti dalle esperienze di KIHLMAN, assicu-

TABELLA I

Effetti citologici in apici radicali di cipolla nel ciclo mitotico della ripresa successiva a trattamento con soluzioni di arancio di acridina al buio. B'' e B': rottura cromosomica e cromatidica rispettivamente. B « partial »: rottura parziale. Indice di « rearrangement »: percentuale di B'' che andarono incontro a riunione.

Arancio di acridina ($\times 10^{-6}M/l$)	B''		B'		B « partial » per anafase	Indice di « rear- rangement »
	per anafase	per anafase aberrante	per anafase	per anafase aberrante		
370, 4 h	4,23	8,46	0,03	0,06	0,15	13,28
185, 24 h	1,19	3,66	0,06	0,21	0,20	17,56
92,5, 24 h	1,36	2,96	0,12	0,27	0,52	8,16
0 (Controllo)	0	0	0	0	0	0
74, 24 h	2,38	5,65	0	0	0,02	16,74
37, 24 h	1,82	6,22	0,02	0,08	0,12	4,01
18,5 24 h	0,5	2,82	0,01	0,28	0,13	6,62
0 (Controllo)	0	0	0	0	0	0

TABELLA II

Effetti citologici su apici radicali di cipolla di soluzioni di arancio di acridina da sole o combinate con post-trattamento con acido nucleico da lievito (esperimenti al buio). Indice mitotico: percentuale di cellule in mitosi calcolata su un totale di 6400 cellule in 4 apici radicali. B'' e B': rottura cromosomica e cromatidica rispettivamente.

Arancio di acridina ($\times 10^{-6}M/l$)	Post-trattamento acido nucleico (6 h)	Periodo privo di mitosi (giorni)	Indice mitotico	Anafasi aberranti %	B'' per anafase	B' per anafase
0 (Controllo)	—	0	6,32	0	0	0
370, 4 h	25 gr/l	4	4,41	46,49	2,49	0,06
370, 4 h	—	6	2,08	50,00	4,23	0,03
185, 24 h	12,5 gr/l	3	3,54	46,15	1,58	0,07
185, 24 h	—	7	3,30	32,55	1,19	0,06
92,5 24 h	6,25 gr/l	3	5,11	42,05	1,97	0,70

18,3 24 h 1 4,47 17,77 0,50 0,01
 18,5 24 h 2 8,00 0 0
 0 (Controllo) 0

TABELLA III

Effetti citologici indotti da un trattamento di radici di cipolla in soluzione di acridina da solo o seguito da illuminazione in presenza di ossigeno (100%) o di aria ($O_2 = 20\%$). Indice mitotico: percentuale di cellule in mitosi calcolata su un totale di 6400 cellule in 4 apici. B" e B': rottura cromosomica e cromatidica rispettivamente. B « partial »: rottura parziale.

Arancio di acridina ($\times 10^{-6}M/l$)	Illuminazione, 40'	% ossigeno	Periodo privo di mitosi (giorni)	Indice mitotico	Anafasi aberranti %	B" per anafase	B' per anafase	B « partial » per anafase
9,25, 24 h	-	20	0	5,74	6,00	0,02	0	0,05
9,25, " "	+	100	letale (++)					
4,62, " "	-	20	0	5,24	0	0	0	0
4,62, " "	+	100	letale (++)					
2,31, " "	-	20	0	5,85	0	0	0	0
2,31, " "	+	100	letale (++)					
1,15, " "	-	20	0	5,99	0	0	0	0
1,15, " "	+	100	3	5,69	22,15 (++)	0,19	0,10	0,20
1,15, " "	+	20	3	5,46	4,34	0	0	0,04
1,15, " "	-	100	2	4,77	0	0	0	0
0 " "	+	100	0	5,19	0	0	0	0
0 " "	-	100	0	9,13	0	0	0	0
0 " "	+	20	0	7,45	0	0	0	0
0,57, " "	+	100	2		0	0	0	0
0,28, " "	+	100	2		0	0	0	0
0,14, " "	+	100	1		0	0	0	0
0,07, " "	+	100	0-1		0	0	0	0

(+ + +) Deturgescenza delle radici.
 (+ +) Una parte delle radici non riprende per differenziazione dell'apice.

randoci la perfetta rispondenza delle due prove, permette di fare alcune interessanti osservazioni circa l'azione fotodinamica dell'arancio di acridina sui due tests. Anzitutto, la concentrazione necessaria per avere un effetto mutageno su *Allium* ($1,15 \times 10^{-6} \text{M/l}$) è circa 3-4 volte minore di quella utile per avere l'effetto su *Vicia* ($3,5-5 \times 10^{-6} \text{M/l}$). A questo riguardo, è notevole il fatto che queste sole concentrazioni, con 40'-60' di illuminazione, hanno fornito nei due tests, un effetto fotodinamico sotto forma di modificazioni strutturali. Nostre prove su *Allium*, con diverse concentrazioni e diversi tempi di illuminazione, non hanno mai dato un effetto mutageno; come risulta dal lavoro di KIHLMAN, lo stesso si può dire per il test *Vicia*.

Un'altra osservazione interessante riguarda il periodo privo di mitosi, che in *Allium* si manifesta sempre come primo effetto sia nei trattamenti al buio che in quelli alla luce, con una durata variabile da due a diversi giorni, mentre in *Vicia* le mitosi proseguono regolarmente e le modificazioni strutturali, di tipo cromatidico, sono rilevabili già dopo 24 ore dal trasferimento delle radici in acqua.

Un altro fatto, a nostro parere di una certa importanza, è emerso dalla presente ricerca; precisamente, l'analogia dei valori-limite del potere mitoinibitore dell'arancio di acridina alla luce ($0,07 \times 10^{-6} \text{M/l}$) con i dati del BAUCH (1949), indicanti che una identica concentrazione di tripaflavina (1:50 milioni) rappresenta il valore-limite per indurre la fluorescenza nei nuclei in riposo della epidermide di cipolla. Valori-limite vicini a quelli da noi stabiliti per la ripresa delle mitosi in *Allium* dopo trattamento con arancio di acridina alla luce, sono stati trovati da HILL, BENSCH e KING (1960). Questi ricercatori, lavorando su colture di cellule animali, hanno constatato inibizione della mitosi per 2-3 giorni dopo illuminazione in presenza di arancio di acridina nella concentrazione di $1 \times 10^{-6} \text{M/l}$.

Un ultimo rilievo riguarda lo spostamento, rivelato dalla presente ricerca, del valore-limite per la ripresa delle mitosi nelle prove alla luce rispetto a quelle eseguite al buio; spostamento veramente notevole essendo necessaria alla luce una concentrazione 132 volte minore di quella determinante al buio un identico effetto citologico (da $9,25 \times 10^{-6} \text{M/l}$ a $0,07 \times 10^{-6} \text{M/l}$). Con la differenza, da tener presente, che, mentre nel caso della concentrazione $9,25 \times 10^{-6} \text{M/l}$ al buio si aveva un'ottima ripresa di tutte le radici, nella concentrazione di $0,07 \times 10^{-6} \text{M/l}$ alla luce una parte delle radici non riprendeva per differenziazione dell'apice.

Concludendo, l'arancio di acridina manifesta la sua azione mutagenica sul test *Allium* sia come fotosensibilizzatore sia indipendentemente dalla luce, mentre su *Vicia faba* esso ha un'azione puramente fotodinamica. Se le differenze riscontrate nei due tests siano dovute a una diversa, particolare organizzazione cromosomica (con la possibilità di formazione di complessi acridina-acidi

nucleici diversi nei due tests) o a qualche altra differenza fra le due specie, resta un problema da chiarire. Data la presenza, nei cromosomi di *Vicia*, di zone eterocromatiche, sarebbe interessante controllare se le rotture dovute all'azione fotodinamica dell'arancio di acridina non siano localizzate in queste zone indicando un'azione specifica del colorante per certe regioni cromosomiche. Un tale dato, a cui KIHLMAN non accenna nel suo lavoro, potrebbe in parte far luce sul problema del diverso comportamento dei due tests rispetto all'arancio di acridina.

BIBLIOGRAFIA

- ARMSTRONG J. A., 1956. — *Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence*. Exptl. Cell Research, **11**: 640-643.
- BAUCH R., 1948. — *Irreversible Chromosomenschädigungen durch Trypaflavin*. Planta, **35**: 536-554.
- , 1949. — *Selektive Speicherung von Trypaflavin durch die Nukleoproteide der Chromosomen*. Biol. Zentralblatt, **68**: 113-118.
- BEERS R. F. Jr., HENDLEY D. D. and STEINER R. F., 1958. — *Inhibition and activation of polynucleotide phosphorylase through the formation of complexes between acridine orange and polynucleotides*. Nature, **182**: 242.
- D'AMATO F., 1946. — *Osservazioni critiche su alcuni metodi di impiego della reazione nucleale in citologia vegetale*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **53**: 657-668.
- , 1950. — *Studio statistico dell'attività mutagena dell'acridina e derivati*. Caryologia, **2**: 229-297.
- D'AMATO F. and D'AMATO AVANZI M. G., 1954. — *The chromosome-breaking effect of coumarin derivatives in the Allium test*. Caryologia, **6**: 134-150.
- DEMEREK M., 1949. — *Chemical mutagens*. Proc. VIII Intern. Congr. Genetics (Hereditas): 201-209.
- DÖRING H., 1938. — *Photosensibilisierung der Gene?* Naturwissenschaften, **26**: 819-820.
- EPHRUSSI B., 1949. — *Action de l'acriflavine sur les Levures*. Proc. VIII International Congr. Genetics (Hereditas): 566-567.
- FEULGEN R., 1913. — *Das Verhalten der echten Nukleinsäure zu Farbstoffen*. II. Zeitschr. Physiol. Chemie, **84**: 309-328.
- HILL R. B., BENSCH K. G. Jr. and KING D. W., 1959. — *Photosensitization of nucleic acids and proteins*. Exptl. Cell Research, **21**: 106-117.
- KAPLAN R., 1948. — *Auslösung von Mutationen durch sichtbares Licht im vitalgefärbten Bacterium prodigiosum*. Naturwissenschaften, **4**: 127.
- KIHLMAN B. A., 1959. — *Induction of structural chromosome changes by visible light*. Nature, **183**: 976-978.
- LETTRE H. und LETTRE R., 1947. — *Aufhebung der Wirkung von Mitosegiften durch chemische Faktoren*. Naturwissenschaften, **33**: 283-284.
- MC ILWAIN H., 1941. — *A nutritional investigation of the antibacterial action of acriflavine*. Biochem. Journal, **35**: 1311-1319.
- MORTHLAND F. W., DE BRUYN P. P. H. and SMITH N. H., 1954. — *Interaction of nucleic acids with aminoacridines and other basic dyes*. Exptl. Cell Research, **7**: 201-214.
- NUTI RONCHI V. and D'AMATO F., 1961. — *New data on chromosome breakage by acridine orange in the Allium test*. Caryologia, **14**: 163-165.
- PATTERSON E. K., 1942. — *The photodynamic action of neutral red on root tips of barley seedlings*. II. Abnormalities of cells and tissues. Amer. Journ. Bot., **29**: 109-121.
- WITKIN E. M., 1947. — *Mutations in Echerichia coli induced by chemical agents*. Cold Spring Harb. Symp., **12**: 256-269.

SUMMARY

(New data on chromosome breakage by acridine orange in the « *Allium* » test)

The author has studied the cytological effect of acridine orange (AO) in the root tips of onion bulbs and broad bean seedlings.

In a first series of experiments, onion roots, treated with AO solutions from 100 to 5 ppm ($370-18,5 \times 10^{-6} \text{M/l}$) for either 4 or 24 hours in the dark at 18°C ., were transferred into water in the dark and investigated cytologically every 24 hours. After a mitosis-free period of different duration, according to the treatment used, structural changes (fragments, dicentric, centric and acentric rings), generally of chromosomal type, were observed. In Table I, the percentage of aberrant anaphases is reported together with the mean number of chromosomes (B'') and chromatid breaks (B') both per anaphase and per aberrant anaphase. The mean number of partial breaks per anaphase and a « rearrangement index », i.e. the percentage of breaks which underwent reunion, are also indicated.

In a second experiment, an attempt was made to investigate some possible detoxicating effect of nucleic acid on the cytological action of AO. Onion roots, treated with AO solutions in conditions identical to the ones of the first experiment, were subjected to a 6-hour post-treatment with yeast nucleic acid solutions containing 250 parts in weight for each part of AO. (cf. BAUCH 1949), before being transferred into water. From Table II it is seen that the post-treatments used either shortened or prolonged the duration of the mitosis-free period; but, in all cases, improved the general recovery of the roots (see mitotic index). Percentages of aberrant anaphases and frequencies of chromosomal changes observed in the treatments with AO alone did not differ consistently from the ones induced by AO plus nucleic acid post-treatment.

In Table III, the results of experiments in which AO-treated onion roots were subjected to illumination for 40 minutes in water in the presence of oxygen (100 and 20% in the gas phase), according to the technique described by KIHLMAN (1959), are reported. Illumination in 100 per cent oxygen of roots treated with AO solutions from $9,25$ to $2,31 \times 10^{-6} \text{M/l}$ resulted in a killing effect whilst, at $1,15 \times 10^{-6} \text{M/l}$ only, chromosomal changes were observed in the mitotic cycle following the mitosis-free period. The minimum AO concentration inducing mitosis inhibition in presence of light was found to be $0,07 \times 10^{-6} \text{M/l}$, a concentration 132 times less than the threshold value of the mitosis-inhibiting effect of AO in the dark ($9,27 \times 10^{-6} \text{M/l}$). Of special interest appears the finding that the AO threshold concentration for mitosis inhibition in the onion ($0,07 \times 10^{-6} \text{M/l}$) is identical to the threshold concentration for the induction of fluorescence in onion nuclei by another acridine derivative, namely, tryptaflavine (cf. BAUCH 1949).

Since experiments on an italian broad bean variety gave results quite comparable to the ones reported by KIHLMAN (1959), it can be concluded that a photodynamic effect of acridine orange is demonstrated on both the broad bean and the onion root. However, contrary to the behaviour of the broad bean root, the onion root responds easily to the chromosome-breaking effect of acridine orange in the dark. Whether this differential response rests on the particular chromosomal organization of *Vicia faba* or on other differences between the two species remains an open question.

RIASSUNTO

L'Autore ha studiato l'effetto citologico dell'arancio di acridina sui meristemi radicali di bulbi di cipolla e di semi germinati di fava. Le esperienze, con concentrazioni di arancio di acridina da 100 a 5 ppm, hanno dimostrato un'azione mutagena del colorante al buio, confermando, per tipi e frequenze di aberrazioni cromosomiche, i dati forniti da D'AMATO (1950). Le stesse concentrazioni sono state del tutto inattive come mutagene sul test *Vicia* al buio.

Negli apici radicali di cipolla, l'arancio di acridina ha dimostrato di agire anche come fotosensibilizzatore in presenza di luce e di ossigeno puro, provocando, a concentrazioni molto diluite ($1,15 \times 10^{-6} \text{M/l}$), modificazioni strutturali cromosomiche nel ciclo mitotico seguente un periodo privo di mitosi della durata di 3 giorni. Poichè i trattamenti su semi germinati di *Vicia* hanno dato risultati del tutto comparabili con quelli di KIHLMAN (1959), è possibile concludere che l'arancio di acridina manifesta la sua azione mutagena sul test *Allium* sia come fotosensibilizzatore sia indipendentemente dalla luce, mentre su *Vicia faba* esso ha un'azione puramente fotodinamica.



ANEUPLOIDY IN *BOTHRIOCHLOA* HYBRIDS

H. R. CHHEDA, J. M. J. DE WET and J. R. HARLAN

Departments of Agronomy and Botany and Plant Pathology, Oklahoma State University,
Stillwater, Oklahoma, U.S.A.

Received: 25th February 1961*

Data regarding the occurrence of aneuploidy in plant species are steadily increasing. A survey of the literature discloses reported aneuploidy in at least 21 genera belonging to the family Gramineae.

The genus *Bothriochloa* in tropical is its distribution and is comprised of approximately 45 described species. CELARIER and HARLAN (1957) and HARLAN *et al.* (1958), from their studies on the Old World species of *Bothriochloa*, *Dichanthium* and *Capillipedium*, indicated that diploids are strictly sexual, the tetraploids mostly asexual but include some facultative types, whereas the pentaploids and hexaploids are essentially obligate apomicts. CHURCH (1940), BROWN (1950), GOULD (1956, 1957), among others reported chromosome numbers of $2n = 40$, 50, 60, 80, 100, 120 and 180 in *Bothriochloa*. KUWADA (1919) and KRISHNASWAMY (1941) reported aneuploid chromosome numbers in *B. ischaemum* which were questioned by later workers, BROWN (1950) and CELARIER (1957). The present study, reports the occurrence of aneuploidy in hybrids, produced and studied for determining species relationships within *Bothriochloa*.

MATERIALS AND METHODS

Plants were grown at the Oklahoma Agricultural Experiment Station. The standard procedures of layout and management were described by CELARIER and HARLAN (1956b). Hybrids were obtained by W. L. Richardson following his standardized technique (RICHARDSON 1958).

Cytological studies were made exclusively from bud material fixed in Carnoy's fluid and stored in a refrigerator. Anthers were smeared in acetocarmine, slides were sealed and occasionally made permanent. In plants with irregular meiotic behavior and in aneuploid material, not less than 25 cells were studied at diakinesis and metaphase I, as well as between 30 and 40 cells at anaphase I and telophase I. Second division was studied whenever possible.

RESULTS

Typical chromosome numbers and meiotic behaviour in « Bothriochloa ».

Two hundred and four collections, of *Bothriochloa* received from different regions of the world and classified into 18 different species have so far been studied cytologically. These data are summarized in Table I.

* Work supported in part by Grant 10742, National Science Foundation.

TABLE I.
Chromosome numbers and meiotic behaviour in species of "Bothriochloa"

Name	Origin	No. of col.	2n	Meiotic behaviour	Authority
<i>B. alta</i> (Hitch.) Henr.	America	3	120	Regular	GOULD 1956, 1957
<i>B. ambigua</i> Blake	Australia	1	60	Regular	
<i>B. barbinodis</i> (Lag.) Hester	America	1	120 180 80	Regular	GOULD 1956, 1957 BROWN 1950
<i>B. caucasica</i> (Trin.) C. E. Hubb.	Georgia, USSR	5	40	Regular to slightly irregular	CELARIER & HARLAN 1957
<i>B. decipiens</i> (Hack.) C. E. Hubb.	Australia	4 1	40 78	Regular Regular	
<i>B. edwardsiana</i> (Gould) Parodi	America	1	60	Regular	GOULD 1957
<i>B. erianthoides</i> (E. M. Meull.) C. E. Hubb.	Australia	1	60	Regular	
<i>B. ewartiana</i> (Domin.)	Australia	2	60	Irregular	
<i>B. exaristata</i> (Nash) Henr.	America	1	60	Regular	GOULD 1957, 1953
<i>B. glabra</i> (Roxb.) A. Camus	India, Africa	1	40 60	Regular	GOULD 1956, DE WET 1954 GOULD 1956
<i>B. hybrida</i> (Gould) Gould	America		120		GOULD 1957
<i>B. insculpta</i> A. Camus	Africa	4	60	Slightly irregular to irregular	GOULD 1957, DE WET & ANDERSON 1956, CELARIER & HARLAN 1957, DE WET 1958
<i>B. intermedia</i> (R. Br.) A. Camus	India, Australia	38 5 1	40 60 80	Regular to irregular Irregular Irregular	GOULD 1956, CELARIER & HARLAN 1956a

<i>B. oaroides</i> (Lisboa) A. Camus	Mediterranean	1	60		
<i>B. panormitana</i> (Parl.) Pilger	India	46	40 60	Regular to irregular	CELARIER & HARLAN 1957
<i>B. pertusa</i> (Willd.) A. Camus	Africa	2	40	Regular	CELARIER & HARLAN 1957
<i>B. radicans</i> (Lehm.) A. Camus	America		120		GOULD 1957, BROWN 1950
<i>B. reevesii</i> (Gould) Gould	America	1	60 120 100	Regular	GOULD 1956 GOULD 1957 CHURCH 1940
<i>B. saccharoides</i> (Sw.) Rydb.	America		120		GOULD 1957
<i>B. springfieldii</i> (Gould) Gould	America		120		GOULD 1956
<i>B. wrightii</i> (Hack.) Henr.					

TABLE II.
Chromosome configuration of aneuploid plants in an open pollinated population of (X-750) at diakinesis and metaphase I.

Tetraploids on the basis of $n = 10$, were found in 9 species, pentaploids only in *B. ischaemum* and *B. pertusa*, and hexaploids were present in 12 species. The American species of *Bothriochloa* are high polyploids with somatic chromosome complements ranging from $2n = 60$ to 180. The cytological studies further revealed the presence of different ploidy levels in seven different species. Among the 204 collections studied only one, *B. decipiens* from Australia, was an aneuploid, with 78 chromosomes. The meiotic behavior of chromosomes in different collections of *Bothriochloa*, may for the purpose of brevity, be classified into four groups.

Regular: When at diakinesis and metaphase I on an average less than 1 univalent was recorded and the range of univalents was from 0 to 4. The presence of univalents was due mainly to the precocious disjunction of one or two bivalents. Chromosome distribution during anaphase I was essentially regular.

Slightly irregular: When at diakinesis and metaphase I, on an average, up to 3 univalents were recorded and the range of univalents was 0 to 6. Two to 3 lagging chromosomes were always observed during anaphase I.

Irregular: When at diakinesis and metaphase I on an average 3 to 5 univalents were observed and the range of univalents was from 0 to 10. Laggards, both dividing and nondividing, were common at anaphase I and micronuclei were often produced.

Very Irregular: When at diakinesis and metaphase I, on an average, more than 5 univalents were observed and the range of univalents was from 2 to 16. Laggard were always observed at anaphase I in large numbers and they commonly form micronuclei.

Sticky chromosomes, bridges and fragments were also seen in some collections. Quadrivalents, though never high in frequency, were quite common in numerous collections. Trivalents were rare.

Eighty-seven different collections representing 18 species belonging to 3 genera (12 spp. of *Bothriochloa*, 4 spp. of *Dichanthium* and 2 spp. of *Capillipe-*

Figs. 1 to 10. — Show meiosis in some *Bothriochloa* sp. (1350 \times).

Fig. 1. — Metaphase in *B. saccharoides* showing 30 bivalents.

Fig. 2. — Metaphase I in *B. erianthoides* showing 30 bivalents.

Fig. 3. — Metaphase I in *B. intermedia* showing 20 bivalents.

Fig. 4. — Anaphase I in *B. caucasica* showing regular distribution of chromosomes.

Fig. 5. — Metaphase I in *B. ischaemum* showing 19 bivalents and 2 univalents.

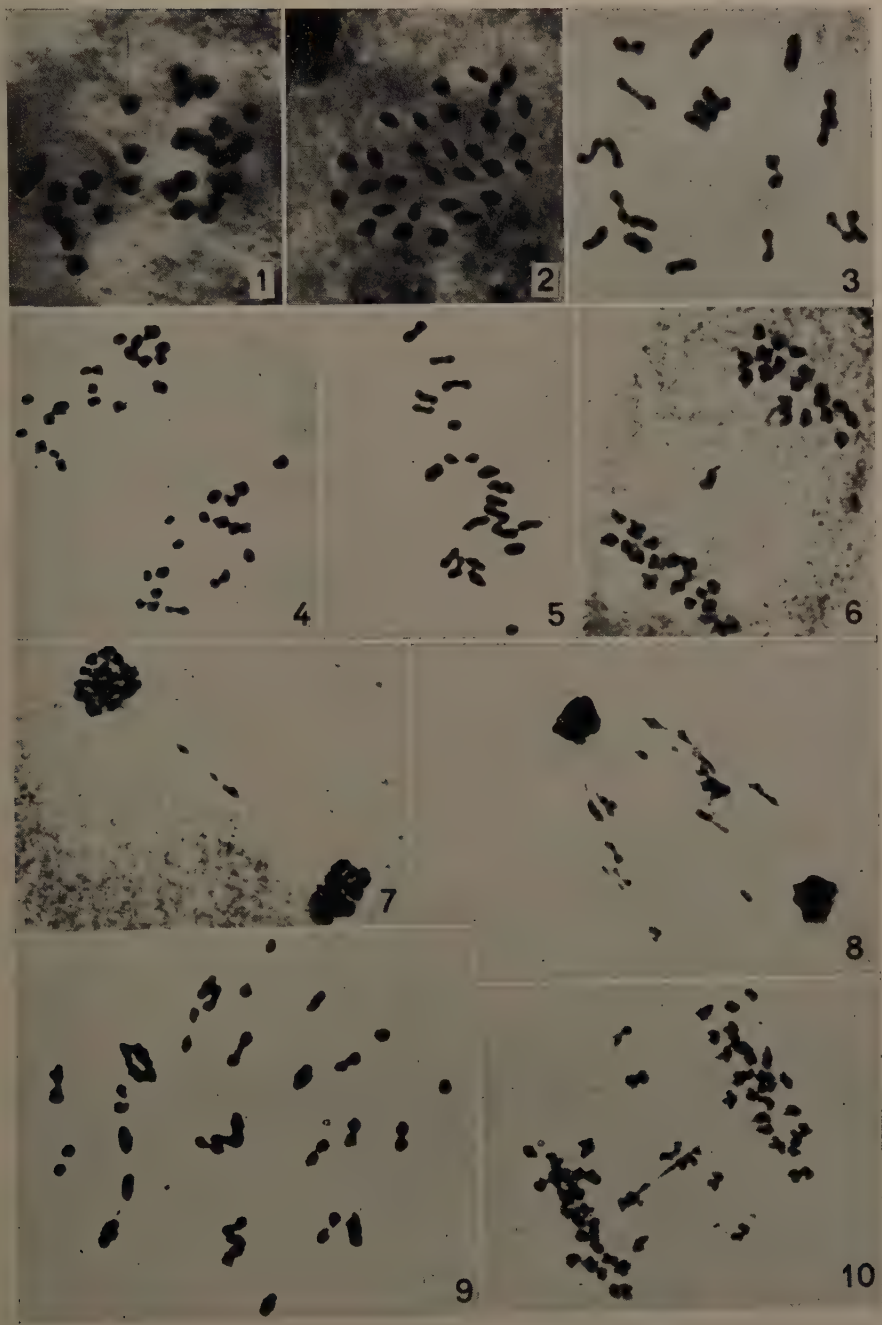
Fig. 6. — Anaphase I in *B. pertusa* showing a dividing laggard.

Fig. 7. — Telophase I in *B. caucasica* showing 2 laggards.

Fig. 8. — Telophase I in *B. intermedia* showing a large number of laggards.

Fig. 9. — Metaphase I in *B. ischaemum* showing numerous univalents and a quadrivalent.

Fig. 10. — Anaphase I in *B. ischaemum* showing dividing univalents, a bridge and a fragment.



dium) were used in the hybridization program. The chromosome numbers of the parents involved range from 20 to 120 and hybrids involving the following combinations were produced. Intergeneric hybrids: *Bothriochloa intermedia* with various species of *Capillipedium*, and *Dichanthium*; interspecific hybrids between various species of *Bothriochloa* and; hybrids involving parents with the same or different chromosome numbers.

Five hundred and thirty-two different hybrids were recorded and 252 of these have been studied cytologically. Aneuploidy was recorded in 21 hybrids. The meiotic behavior of these hybrids is variable, depending upon the relationship of the parents involved, and ranged from irregular to very irregular.

Cytological Studies of Aneuploids.

By crossing two facultative apomictic tetraploid *B. intermedia* plants a highly self sterile and completely sexual plant (X-750) was obtained. When the open pollinated progeny of this plant was grown, a wide range of morphological variation was observed which could have resulted from natural pollination by a wide variety of species and genera. A detailed cytomorphological study of this population has been completed and will be reported elsewhere.

Out of the 35 plants which have been studied cytologically 5 were aneuploids. In Table II is presented the somatic chromosome number of each of these plants and the range and average frequency of chromosome configurations per cell at diakinesis and metaphase I. The chromosome number of these plants range from 38 to 41. Meiotic behaviour varies from plant to plant.

The maternal parent (X-750) has a very irregular chromosome behaviour. It is characterized on an average by 7.32 univalents and the frequency of univalents range was from 0 to 16 per cell. Quadrivalents were never observed and trivalents are only occasionally formed.

It becomes apparent from Table II that while plant 9 is fairly regular in its meiotic behaviour, plant 21 is almost completely desynaptic. Quadrivalents

Figs. 11 to 20. — Show aneuploid in different hybrids (1350 \times).

Fig. 11. — Early anaphase I showing $2n=41$. (X-750-O.P. 10.

Fig. 12. — Metaphase I in an aneuploid hybrid ($2n=41$) showing numerous univalents and 2 trivalents. (X-750)-O.P. 10.

Fig. 13. — Early anaphase I showing $2n=42$. [(X-750) \times *B. isch.* 6182] - 5.

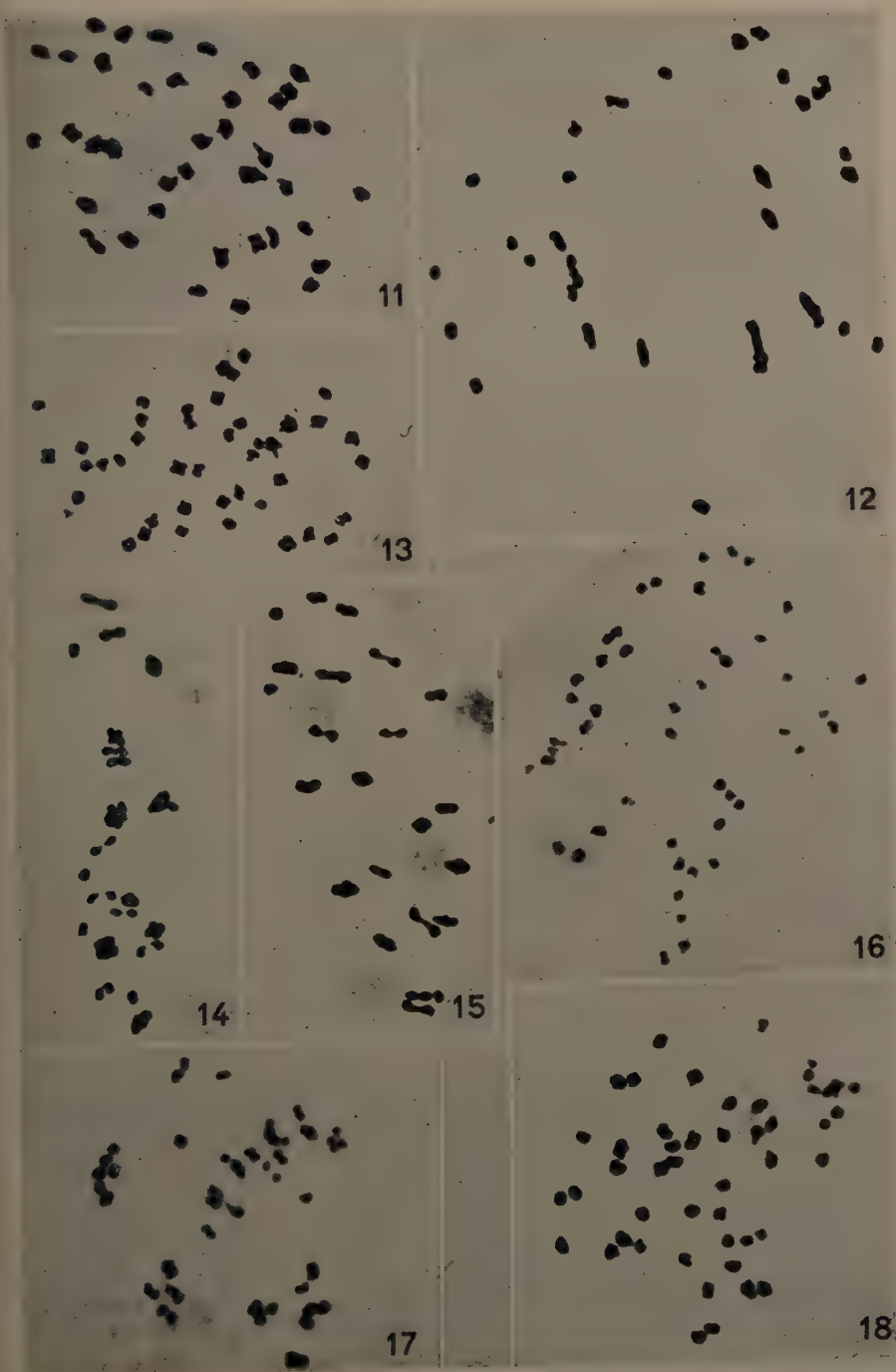
Fig. 14. — Metaphase I in an aneuploid hybrid ($2n=42$) showing a trivalent and a quadrivalent. [(X-750) \times *B. isch.* 6182] - 9.

Fig. 15. — Metaphase I in an aneuploid hybrid ($2n=43$) showing 20 bivalents and 3 univalents. [*B. int.* 5168 b \times *B. isch.* 7162] - 1.

Fig. 16. — Anaphase I showing 11 laggards and $2n=46$. [(X-750) \times *B. isch.* 6182] - 7.

Fig. 17. — Anaphase I in an aneuploid hybrid ($2n=39$) with 19 dividing univalents. [(X-750) \times *B. int.* 5410 b] - 1.

Fig. 18. — Early anaphase I showing $2n=48$. [(X-750) \times *B. isch.* 6182] - 1.



are commonly encountered in plant 23 whereas plant 10 has a high trivalent frequency. Plant 29 resembles the maternal parent in its meiotic behaviour although it has one chromosome less.

The anaphase I and telophase I studies of the maternal parent (X-750) indicate a large number of dividing and undivided laggards (ave. 6.4 per cell), as well as unequal distribution of chromosomes at anaphase I, such as 18-22 and 19-21. The laggards frequently formed from 1 to 4 micronuclei. No bridges or fragments were recorded. Laggards and unequal chromosome distributions at anaphase I was prevalent in all aneuploid plants. The frequency of laggards varied from one plant to another relative to the irregularities observed at diakinesis and metaphase I. Up to 4 micronuclei were recorded though the frequency ranged between 1 and 2 per dyad.

Among the various hybrid populations so far studied, complete aneuploidy was found only in one hybrid population. The male parent of this population was a hexaploid *B. ischaemum*, from Burma. Instead of the expected $2n = 50$ chromosome number in the hybrid population the number ranged from 41 to 48. Ten of the hybrids were studied cytologically and the information is presented in Table III.

The meiotic behaviour of (X-750), as was indicated earlier, is extremely irregular. The *B. ischaemum* parent, a hexaploid, is also irregular in its meiotic behaviour. The average number of univalents per cell was low (1.73), but quadrivalents and trivalents were commonly observed. At anaphase I as many as 10 dividing laggards were recorded. Average number of laggards per cell was 4.8, with unequal distribution of chromosomes at anaphase and numerous micronuclei at the dyad stage. Occasionally at metaphase I, one or two bridges and a fragment were observed.

The meiotic behaviour of the hybrids is correlated with different chromosome numbers. The number of bivalents is relatively constant, varying between 15 to 20 per cell. The average number of univalents per cell ranged from as low as 2 in one hybrid to as high as 10 in another. Quadrivalents were commonly observed in all hybrids, but trivalent frequency is low.

At anaphase and telophase I large numbers of laggards, dividing and undividing, were recorded in all hybrids. Unequal distribution of chromosomes at anaphase I was consequently common. Micronuclei were observed in all hybrids and instances as high as 7 micronuclei were recorded.

Except for the hybrid population of (X-750) \times *B. ischaemum*, no other population consisting of only aneuploid plants was observed. Presence of occasional aneuploid plants in a hybrid population, however, was rather common. In Table IV are recorded the chromosome configurations of some of these aneuploid hybrids at diakinesis and metaphase I.

Chromosome configurations of « *B. intermedia* (X-750) » × « *B. ischaemum* 6182 » hybrids at diakinesis and metaphase I.

Plant	2n	Range				Av. per cell			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
<i>Parents</i> (X-750)	40	0-16	12-20	0-1	0	7.32	16.29	0.03	0.00
<i>B. ischaemum</i> 6182	60	0-4	26-30	0-2	0-1	1.73	28.15	0.18	0.36
<i>Hybrids</i>									
— 1	48	1-6	16-21	0-2	0-2	3.89	19.26	0.47	1.00
— 2	44	2-7	15-20	0-1	0-1	5.69	17.95	0.38	0.31
— 3	47	6-13	15-19	0-1	0-1	9.8	17.64	0.45	0.10
— 4	44	4-10	16-20	0-1	0-1	7.25	18.00	0.25	0.00
— 5	42	0-6	15-21	0	0-2	3.33	18.22	0.00	0.55
— 6	42	0-6	15-20	0	0-2	4.1	18.00	0.27	0.27
— 7	46	2-6	19-21	0	0-1	4.25	20.38	0.00	0.25
— 8	41	1-5	13-18	0-1	1-3	2.00	15.33	0.11	2.00
— 9	42	2-11	13-19	0-1	0-2	6.25	15.42	0.42	0.91
— 10	41	1-5	14-19	0-2	0-2	3.00	16.75	0.50	0.75

TABLE IV

Chromosome configurations of some aneuploid hybrids at diakinesis and metaphase I°.

Plant	2n	Range		Av. per cell	
(X-750) - (Selfed)	42	0-4	19-21	0	0.7
(X-750) × <i>B. int.</i> 5410b	39	13-21	5-11	0-1	17.0
(X-750) × <i>B. cauc.</i> 4066	39	1-13	13-19	0	5.87
<i>B. int.</i> 2655 × <i>B. int.</i> 5410	61	0-5	22-30	0-4	2.64
<i>B. int.</i> 5168b × <i>B. isch.</i> 7162	43	1-7	18-21	0-1	3.62
<i>B. int.</i> 5450 × <i>Cap. spicl.</i> 4599	47	5-19	12-21	0-1	10.47
					20.65
					9.44
					16.56
					25.87
					19.32
					17.92
					0.00
					0.11
					0.00
					1.28
					0.07
					0.18

* (X-750). = *Bothriochloa intermedia*; *B. int.* = *Bothriochloa intermedia*; *B. cauc.* = *B. caucasica*; *B. isch.* = *B. ischaemum*; *Cap. spicl.* = *Capillipedium spicigerum*.

The main purpose of presenting these data is to emphasize the fact that even though aneuploidy was more common when (X-750) was used as one of the parents, aneuploidy was also encountered in other hybrids.

In order to establish the degree of self sterility, (X-750) was self-pollinated. Only one plant was obtained and it had 42 chromosomes. The meiotic behavior was regular and morphologically it was very similar to the parent except in its reduced size.

The cytology of the *B. intermedia* 2655 \times *B. intermedia* 5410 hybrid was of particular interest. Both the parents had $2n = 40$ chromosomes and were fairly regular in their meiotic behavior. The resulting hybrid with $2n = 61$ chromosomes is presumed to have originated after fertilization of an unreduced functional egg ($2n + 1$) by normal pollen. It is also possible that the extra chromosome could have come from the male parent.

DISCUSSION

The origins of aneuploidy in plants were discussed by various workers. DARLINGTON (1937) summarized the cytological basis for the occurrence of aneuploidy. Different origins were put forward by ÖSTERGREN (1947), MELANDER (1950), CLELAND (1951), and WHITE (1954). With respect to size, morphology and heterochromacity, extra chromosomes, in most cases are easily identified, morphologically from the chromosomes of the normal complement. HAKANSSON (1949), VASEK (1956), and MOORING (1960) however, discussed aneuploid plants where these chromosomes do not differ in size from those of the normal set. In polyploid species, aneuploid plants with one or a few chromosomes missing, or present in excess, usually do not show any significant gross morphological variations from the normal plants.

It is generally assumed that aneuploidy should be comparatively common in a highly polyploid group such as the Gramineae. BOSEMARK (1957) reported the presence of natural aneuploid plants in several members of the family Gramineae. In the genus *Bothriochloa*, however, which is characterized by a series of chromosome numbers ranging from $2n = 40$ to $2n = 180$, HARLAN *et al.* (1958) and GOULD (1958), the occurrence of aneuploidy is rare in nature. On the other hand, experimental data indicate that aneuploid hybrids can be obtained rather easily in this genus when some combinations of parents are involved. Out of 87 different collections used in the hybridization work 9 have produced aneuploid hybrids.

Meiotic chromosome behavior in *Bothriochloa* species ranges from regular to very irregular. The American species of *Bothriochloa* are usually characterized by very high chromosome numbers ranging from $2n = 60$ to $2n = 180$ and the meiotic behavior is regular. Even though the American species are usually sexual

in their mode of reproduction they are cleistogamous. Thus, cleistogamy and normal meiosis seem to be the reasons for the absence of aneuploidy in these species of *Bothriochloa*.

Tetraploid ($2n = 40$), pentaploid and hexaploid representatives of this genus are characterized by various degrees of meiotic irregularities. At anaphase I a varying number of dividing and nondividing laggards are produced. The dividing univalents, often, are incorporated in the daughter nuclei at the dyad stage and in the second division are seen either as nondividing laggards or reach a pole without division. This together with the unequal chromosome distribution at anaphase I, can give rise to the formation of gametes with unequal chromosome complements. As the parents involved are polyploids some gametes with abnormal chromosome complement could be expected to be viable.

The extra chromosomes in the aneuploid plants do not differ in size or morphology from the normal chromosomes in the basic complement. Even though trivalents and quadrivalents were not consistently observed at metaphase I the aneuploid plants are usually characterized by a higher frequency of trivalents and quadrivalents than either of the parents. This suggests that the additional chromosomes originated by means of unequal distribution of chromosomes during gametogenesis.

HARLAN *et al.* (1958) indicated that *Bothriochloa intermedia* hybridizes in nature with species of *Bothriochloa*, such as *B. ischaemum*, *B. pertusa*, *B. ewartiana* and also with species of the genera *Dichanthium* and *Capillipedium*. Aneuploidy could thus be expected in nature. Cytological studies of assumed natural hybrids, however, did not show any aneuploidy, suggesting that some form of natural selection must favor complete genomes in this group of plants.

Aneuploid plants arise and are able to survive only under some specific conditions. ROSEMARK (1956, 1957) suggests a correlation between aneuploid plants of some grasses and edaphic factors. MOORING (1960) speculates that aneuploids in *Clarkia unguiculata* are related to ecological and marginal populations and help the species to tolerate extremes of environmental conditions. In Old World species of *Bothriochloa* the reason for the rare incidence of aneuploids appears to be in their apomictic mode of reproduction. The tetraploids are classified by CELARIER and HARLAN (1957) as facultative apomicts while pentaploids and hexaploids are essentially obligate apomicts. Thus, the chances of hybridization, in nature, are only prevalent in regions where comparatively sexual forms of *Bothriochloa* are found. The degree of apomixis ranges from 75 percent to 100 percent, with the result that cross pollination takes place only occasionally. The probability of obtaining aneuploid plants in nature is therefore low except perhaps in regions where comparatively sexual forms of *Bothriochloa* grow.

Convincing support to the above hypothesis was recently obtained in our

laboratory. Detailed cytological studies of the F_2 population of some apparently sexual tetraploid hybrids, showing genetic segregation are commonly characterized by aneuploid plants.

REFERENCES

- BOSEMARK N. O., 1956. — *On accessory chromosomes in Festuca Pratensis*. III. Frequency and geographical distribution of plants with accessory chromosomes. *Hereditas*, **42**: 189-210.
- , 1957. — *Further studies on accessory chromosomes in grasses*. *Hereditas*, **43**: 236-297.
- BROWN W. V., 1950. — A cytological study of some Texas Gramineae. *Bull. Torrey Club*, **77**: 63-76.
- CELARIER R. P., 1957. — *The cytogeography of Bothriochloa ischaemum complex*. II. Chromosome behavior. *Amer. Jour. Bot.*, **44**: 729-738.
- CELARIER R. P. and HARLAN J. R., 1956a. — *Ann. Report of Progress, Forage Crops Res. Okla.*, 43 pp. (mimeo).
- , 1956b. — *An Andropogoneae garden in Oklahoma*. *Taxon*, **5**: 183-186.
- , 1957. — *Apomixis in Bothriochloa, Dichanthium and Capillipedium*. *Phytomorphology*, **7**: 93-102.
- CHURCH G. L., 1940. — *Cytotaxonomic studies in the Gramineae - Spartina, Andropogon, and Panicum*. *Amer. Jour. Bot.*, **27**: 263-271.
- CLELAND R. E., 1951. — *Extra, diminutive chromosomes in Oenothera*. *Evolution*, **5**: 165-176.
- DARLINGTON D. C., 1937. — *Recent advances in cytology*. 2d. ed., Blakiston, Philadelphia.
- DE WET J. M. J., 1954. — *Chromosome numbers of a few South African grasses*. *Cytologia*, **19**: 97-103.
- , 1958. — *Additional chromosome numbers in Transvaal grasses*. *Cytologia*, **23**: 113-118.
- DE WET J. M. J. and ANDERSON L. J., 1956. — *Chromosome numbers in Transvaal grasses*. *Cytologia*, **21**: 1-10.
- GOULD F. W., 1953. — *A cytotaxonomic study in the genus Andropogon*. *Amer. Jour. Bot.*, **40**: 297-306.
- , 1956. — *Chromosome counts and cytotaxonomic notes on grasses of the tribe Andropogoneae*. *Amer. Jour. Bot.*, **43**: 395-404.
- , 1957. — *New North American Andropogons of subgenus Amphilophis and a key to those species occurring in the United States*. *Madroño*, **14**: 18-29.
- , 1958. — *Chromosome numbers in Southwestern grasses*. *Amer. Jour. Bot.*, **45**: 757-67.
- HAKANSSON A., 1949. — *Supernumerary chromosomes in Godetia viminea*. *Hereditas*, **35**: 375-389.
- HARLAN J. R., CELARIER R. P., RICHARDSON W. L., BROOKS M. H. and MEHRA K. L., 1958. — *Studies on Old World Bluestems II*. *Okla. Agri. Expt. Sta. Tech. Bull.*, T-72: 1-23.
- KUWADA Y., 1919. — *On the number of chromosome in maize*. *Jour. Col. Sci. Imp. Univ. Tokyo*, **39**: 1-148.
- KRISHNASWAMY N., 1941. — *Untersuchungen zur Cytologie und Systematik der Gramineen*. *Bot. Centralb.*, **60**: 1-56.
- MELANDER Y., 1950. — *Accessory chromosomes in animals especially in Polycelis tenuis*. *Hereditas*, **36**: 19-38.
- MOORING J. S., 1960. — *A cytogenetic study of Clarkia unguiculata*. II. *Supernumerary chromosomes*. *Amer. Jour. Bot.*, **47**: 847-854.
- ÖSTEGREN G., 1947. — *Heterochromatic B chromosomes in Anthoxanthum*. *Hereditas*, **33**: 261-296.
- RICHARDSON W. L., 1958. — *A technique of emasculating small grass florets*. *Ind. Jour. Gen. Pl. Br.*, **18**: 69-73.

- ASEK F. C., 1956. — *Induced aneuploidy in Clarkia unguiculata*. Amer. Jour. Bot., **45**: 150-162.
- WHITE M. J. D., 1954. — *Animal cytology and Evolution*. 2d. Ed., University press, Cambridge.

SUMMARY

1. - Chromosome numbers in the genus *Bothriochloa* range from $2n = 40$ to $2n = 180$ multiples of 10.
2. - Meiotic behavior varies from very regular in the New World species to very irregular in some of the Old World species.
3. - Occurrence of aneuploidy is very rare in natural species of *Bothriochloa*.
4. - Intergeneric and interspecific hybrids involving parents at different ploidy levels, can be obtained in the Bothriochloinae.
5. - Occurrence of aneuploidy is common in some hybrids.
6. - The extra chromosomes in the aneuploid plants do not differ in size or morphology from the normal chromosomes in the basic complement.
7. - In the New World species of *Bothriochloa*, absence of aneuploidy seems to be correlated with cleistogamy and regular meiosis.
8. - In the Old World species of *Bothriochloa*, a high degree of apomixis and some form of natural selection for complete genomes seem to be the reasons for extremely rare occurrence of aneuploid plants in nature.
9. - In areas where forms of *Bothriochloa* with a high degree of sexuality are found natural aneuploids may be present.

RIASSUNTO

1. Nel genere *Bothriochloa* i numeri cromosomici vanno da $2n = 40$ a $2n = 180$, secondo multipli di 10.
2. - Il processo meiotico, molto regolare nelle specie del Nuovo Mondo, è invece molto irregolare in alcune specie del Vecchio Mondo.
3. - Casi di aneuploidia sono molto rari tra le specie naturali di *Bothriochloa*.
4. - Nelle Bothriochloinae si possono ottenere ibridi intergenerici e interspecifici con genitori a differenti gradi di ploidia.
5. - In alcuni ibridi sono comuni i casi di aneuploidia.
6. - Nelle piante aneuploidi gli extracromosomi non differiscono per dimensioni e morfologia dai cromosomi normali del corredo basico.
7. - Nelle specie di *Bothriochloa* del Nuovo Mondo sembra che l'assenza di aneuploidia sia in relazione con la cleistogamia e la meiosi regolare.
8. - Nelle specie di *Bothriochloa* del Vecchio Mondo sembra che un alto grado di apomissia ed alcune forme di selezione naturale per i genomi completi siano la ragione dell'estrema scarsità di piante aneuploidi in natura.
9. - Nelle aree in cui si trovano forme di *Bothriochloa* con un alto grado di sessualità possono essere presenti degli aneuploidi naturali.



INVESTIGATIONS ON TOMATO ANTHRACNOSE. I. THE INFLUENCE OF CARBOHYDRATES ON THE GROWTH OF *COLLETOTRICHUM COCCODES* (WALLR.) HUGHES

NICOLA LOPRIENO

Istituto di Genetica dell'Università, Pisa

Received: 15th September 1961

INTRODUCTION

Anthrachnose, a serious disease of the tomato, is known to occur in Eurasia (Italy, France, United Kingdom, USSR, China), Africa (Mozambique, South Africa), North America (U.S.A., Canada) and South America (Brazil).

Tomato anthracnose is typically produced by *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes (1958), a Deuteromycete of the Melanconiales, previously known as *C. phomoides* (Sacc.) Chester (SWANK 1953), a synonymous of *C. gloeosporioides* Penz. (von ARX 1957). It is, however, known that anthracnose symptoms can be induced in tomato, both naturally and experimentally, by other species of *Colletotrichum* (von ARX 1957; ILLMAN 1960). The perfect stage of *Colletotrichum coccodes* has never been found in nature. However, in 1953 SWANK isolated in culture the ascogenous form of the anthracnose organism, by means of which he was able to reproduce the disease on tomato fruits. The author suggested the occurrence of a mutation to account for the origin of the perfect form, which he classified as *Glomerella phomoides* Swank; a species to be included, according to von ARX (1957), in the group of *Glomerella cingulata*.

The pathogen generally infects ripe fruits, but, under field conditions, it can also grow on leaves, thus providing sufficient inoculum to be of importance in fruit infection (PANTIDOU and SCHROEDER 1955). According to ALLISON (1952), the pathogen does not develop on green fruits, probably due to the presence of solanine, which has been found able to inhibit its growth.

Colletotrichum coccodes, when grown on artificial media, shows an extreme morphological variability with several transitions between the sclerotial and the mycelial types (SWANK 1950, 1952; ILLMAN 1960). As shown by KENDRICK and WALKER (1948), the fungus can grow on a mineral medium, although a partial biotin-dependence may occur (GOUGH and LILLY 1956). Investigations on the influence of carbohydrates on growth have demonstrated that *a*) glucose, dextrin and soluble starch are good carbon sources for both growth and sporulation of the fungus (KENDRICK and WALKER 1948), and *b*) l-arabinose is utilized by the pathogen whilst d-arabinose is not (LILLY and BARNETT 1956).

As to the relations of pathogenicity to specific physiological characteristics in *Colletotrichum coccodes*, the only information available at present relates to its strong pectolytic and cellulytic activity (SCHMITTHENNER 1952, 1953; RACHEB and FABIAN 1955).

In view of its economic importance, tomato anthracnose deserves further investigations aiming at an understanding, on both genetic and physiological grounds, of the host-parasite relations in the disease. These investigations may bring new data to the general problem of host-pathogen relations in plants, as already firmly established in several species (a.o., BOONE, KLINE and KEITT 1957; BARNETT 1959; GARBER 1960).

As a first contribution towards a better knowledge of tomato anthracnose, a study has been made of the growth of five monoconidial isolates of *Colletotrichum coccodes* in presence of seven carbohydrates, which are known to occur in the ripe fruits of tomato, namely: d-glucose, d-levulose, sucrose, l-arabinose, d-galactose, d-mannose, d-xylose (KENNETH and BEVENUE 1954).

MATERIALS AND METHODS

For the present investigation five monoconidial isolates from cultures obtained from France and the U.S.A. were used. In a first series of experiments, 8 culture media were prepared by adding to constant doses of KCl (0.07‰), sucrose (50.0‰) and microelements (Mn⁺⁺ 0.01 ppm; Zn⁺⁺ 0.5 ppm; Cu⁺⁺ 0.1 ppm; Fe⁺⁺⁺ 0.3 ppm) two different doses of magnesium, two of phosphorus and two of nitrogen. Since the basal culture medium no. 7 in Table I was found to be the best, it was employed throughout the investigation in a buffered solution at pH ca. 6.0 (mixture of KH₂PO₄ M/15 and Na₂HPO₄ : 2H₂O M/15), to avoid the drop in pH of the culture medium with growth of the fungus. The culture medium was autoclaved in 100 ml Erlenmeyer flasks (23 ml of medium per flask) at 121° C. for 15 minutes. Solutions of the carbohydrates tested were sterilized separately by filtration through Jena glass filter 11 G 5 F and added aseptically to the basal medium (2 ml per flask), to achieve an identical carbon level for each of the carbohydrates (0.95% for sucrose; 1.0% for the remaining sugars and 0.5% each for the mixture d-glucose + d-levulose). The flasks were inoculated with 0.3 ml of a conidial suspension containing 30,000 to 40,000 conidia per ml, obtained from 7-day old cultures of the pathogen grown on Richard's medium (cf. KENDRICK and WALKER 1948) modified by the addition of microelements (Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, and Cu⁺⁺). The flasks were incubated at 25° C. constant in the dark and growth was determined every five days as the mean dry weight of 6-10 replicate cultures. The mycelium was harvested on previously dried and weighed filter paper, repeatedly washed and dried at 80° C. for 12 hours. Changes in pH of the culture media were determined electrometrically.

RESULTS AND DISCUSSION

In Tables I and II the data of the preliminary investigations aiming at establishing the best culture conditions for the growth of *Colletotrichum coccodes* are gathered. From Table I it is seen that the highest mycelial weight is obtained with the culture medium no. 7 (differences ascertained by statistical means); moreover, if the medium is not buffered, a drop in pH at the end of the

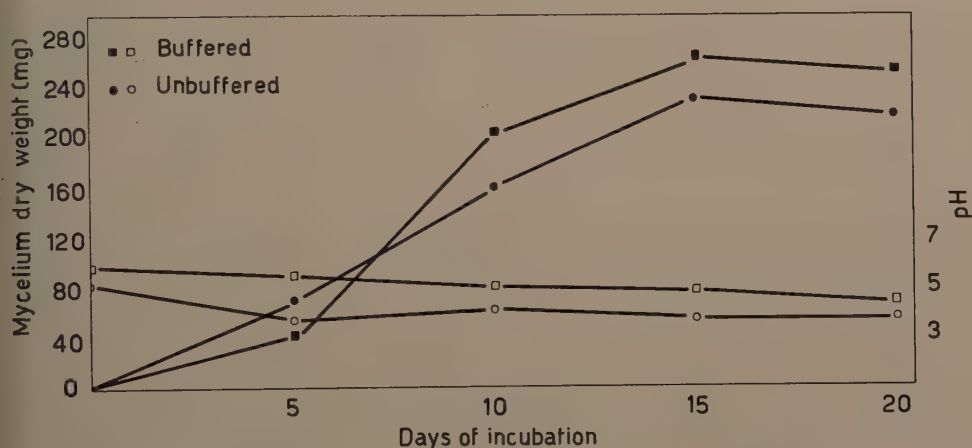


Fig. 1. — Influence of buffering of the medium on growth of *Colletotrichum coccodes*, isolate no. 4.

incubation period is observed in all cases. This seems to be due to the kind of nitrogen source employed, namely ammonium nitrate (*cf.* COCHRANE 1958). If the culture medium is buffered at pH 6.0, although some drop in pH with progressing time takes place (*cf.* Table II and Fig. 1), statistically significant differences in growth are observed between buffered and unbuffered media.

The data on the influence of the different carbohydrates tested on mycelial growth of the five monoconidial isolates of *Colletotrichum coccodes*, together with the changes in pH of the medium during incubation are reported in Table III. In Table IV, for each carbohydrate and for each of the five isolates studied, the values of the maximum growth and the number of days needed to attain it are reported. It is seen that d-galactose, d-mannose and d-xylose are the carbohydrates most promptly utilized, even if, with d-galactose at least, a lag phase is observed at the fifth day. According to COCHRANE (1958), the utilization of galactose or mannose by a given microorganism depends on its ability to convert the compounds into a phosphorylated derivative of glucose. It is possible that

TABLE I

Growth of « Colletotrichum coccodes », isolate no. 4, on different mineral media containing sucrose (50%) and microelements. Determination of mycelium weight and final pH after 20 days of incubation at 25° C.

Culture medium no.	Concentration ‰			Initial pH	Final pH	Mycelium dry weight (mg)
	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃			
1	0.48	0.52	0.80	4.78	2.61	124.59 ± 11.12
2	0.96	0.52	0.80	4.79	2.61	137.40 ± 8.85
3	0.48	1.04	0.80	4.70	2.73	160.40 ± 7.24
4	0.96	1.04	0.80	4.69	2.74	182.70 ± 23.26
5	0.48	0.52	1.60	4.70	2.70	162.43 ± 10.75
6	0.96	0.52	1.60	4.72	2.74	177.84 ± 10.45
7	0.48	1.04	1.60	4.61	2.52	188.06 ± 9.07
8	0.96	1.04	1.60	4.62	2.51	162.79 ± 14.28

TABLE II

Influence of buffering of the medium (no. 7 in table I) on growth of « Colletotrichum coccodes », isolate no. 4.

Culture medium	Mycelium dry weight (mg) after days of incubation				pH after days of incubation			
	5	10	15	20	0 (initial)	5	10	15 20
Unbuffered	71.33 ± 11.33	158.70 ± 11.97	229.00 ± 7.36	215.30 ± 11.97	5.08	3.64	4.07	3.70 3.69
Buffered	41.80 ± 6.52	202.66 ± 10.40	262.11 ± 8.63	250.22 ± 13.07	5.88	5.47	5.00	4.76 4.36

the reduced growth of *Colletotrichum coccodes* observed in the first five days in the presence of galactose, and possibly of mannose, is related to the initial lack of specific enzymes for the above reactions. These enzymes would develop adaptively with progressing time. Contrary to the observation of KENDRICK and WALKER (1948), d-galactose has proved to be a good carbon source for *Colletotrichum coccodes*. It is probable that this disagreement between KENDRICK and WALKER's (1948) results and the present ones are due to the different strains employed.

As to the remaining carbohydrates tested, they all are utilized by the fungus; only the isolate 81 showed a strongly reduced growth in presence of d-levulose, indicating its partial inability to utilize this carbohydrate. In agreement with KELLY and BARNETT (1956), l-arabinose has proved to be a good carbon source for *Colletotrichum coccodes*.

As seen from the pH values of the substrate in Table III, the isolates 4 and 5 do not generally change consistently during growth the initial pH values. On the contrary, a more pronounced drop in pH during incubation is observed with the remaining isolates, probably due to a different nitrogen metabolism in these isolates.

To have a more complete idea of the relative biological value for *Colletotrichum coccodes* of the carbohydrates employed, Table V has been compiled by transforming into relative percentages the values of maximum growth of Table IV, taking the maximum growth of the isolate 4 in d-levulose = 100. A statistical analysis of the data within each isolate allows a classification of the carbohydrates studied according to the following series of decreasing biological values:

Isolate no. 4: d-levulose, d-xylose, d-levulose + d-glucose, d-glucose, d-mannose, d-galactose, sucrose, l-arabinose;

Isolate no. 5: d-levulose, d-xylose, d-galactose, d-mannose, d-levulose + d-glucose, l-arabinose, sucrose, d-glucose;

Isolate no. 32: d-xylose, l-arabinose, d-glucose, d-galactose, d-levulose, d-levulose + d-glucose, d-mannose, sucrose;

Isolate no. 46: d-levulose, l-arabinose, d-glucose, d-levulose + d-glucose, d-xylose, sucrose, d-galactose, d-mannose;

Isolate no. 81: d-galactose, d-xylose, l-arabinose, sucrose, d-mannose, d-glucose, d-levulose + d-glucose, d-levulose.

The above classification makes physiological differences between the various isolates very clear.

Additional evidence for similar differences comes from a statistical analysis

TABLE III

Growth of 5 monoconidial isolates of « Colletotrichum coccodes » in a mineral medium (no. 7 in Table I) with different carbohydrates added.

Carbohydrate	Isolate no.	Mycelium dry weight (mg) after days of incubation				pH after days of incubation				
		5	10	15	20	0 (initial)	5	10	15	20
None (control)	4	4.75			6.41	5.79	5.75			5.80
	5	4.58			6.91	5.79	5.76			5.79
	32	5.33			6.25	5.79	5.76			5.80
	46	6.50			7.58	5.79	5.78			5.80
	81	5.75			6.75	5.79	5.79			5.80
d-levulose	4	35.41 ± 6.14	49.85 ± 4.52	104.40 ± 3.92	54.30 ± 5.63	5.71	5.68	5.40	4.82	4.99
	5	22.73 ± 4.75	28.60 ± 5.14	78.30 ± 6.88	49.60 ± 7.33	5.71	5.54	4.27	3.88	4.40
	32	37.50 ± 5.27	64.68 ± 10.24	74.75 ± 8.17	107.20 ± 10.32	5.71	5.53	4.38	3.61	3.65
	46	36.75 ± 4.63	97.35 ± 14.79	89.00 ± 11.56	79.30 ± 11.34	5.71	5.45	5.31	5.99	6.16
	81	29.00 ± 5.44	40.05 ± 5.67	48.38 ± 7.37	97.25 ± 7.11	5.71	5.51	4.99	4.27	4.66
d-glucose	4	29.65 ± 2.58	126.45 ± 5.70	97.00 ± 3.11	69.75 ± 2.56	5.80	5.50	5.63	5.81	5.79
	5	22.25 ± 1.87	120.66 ± 3.24	88.25 ± 2.93	83.55 ± 3.82	5.80	5.53	4.20	3.63	3.75
	32	55.38 ± 5.48	104.95 ± 3.64	96.65 ± 4.57	86.05 ± 2.57	5.80	5.36	3.92	3.22	3.12
	46	62.80 ± 3.62	64.35 ± 1.84	72.15 ± 3.49	113.95 ± 4.21	5.80	5.32	4.09	4.05	4.35
	81	22.00 ± 2.72	30.15 ± 1.13	41.90 ± 0.74	51.05 ± 4.67	5.80	5.75	5.86	5.88	6.04
sucrose	4	27.33 ± 1.94	54.08 ± 3.20	61.25 ± 4.68	77.70 ± 6.69	5.79	5.44	5.56	5.66	5.72
	5	32.16 ± 4.00	51.16 ± 2.95	56.50 ± 2.46	83.91 ± 2.00	5.79	5.38	4.03	3.86	3.87

	d-glucose	3	31.33 ± 2.43	47.96 ± 3.14	80.2 ± 3.02	93.32 ± 2.89	5.78	4.61	3.28	3.45	3.40
		32	40.50 ± 3.42	75.66 ± 3.51	94.08 ± 2.67	104.42 ± 3.68	5.78	4.87	3.83	4.04	4.62
		46	27.66 ± 3.29	62.08 ± 3.84	84.41 ± 4.27	95.16 ± 7.22	5.78	4.87	3.83	4.04	4.62
		81	57.33 ± 2.55	92.66 ± 1.91	85.50 ± 4.76	84.70 ± 8.49	5.78	3.85	3.30	3.90	4.94
	l-arabinose	4	17.83 ± 1.45	57.90 ± 4.78	58.70 ± 3.60	76.30 ± 8.73	5.66	5.53	4.41	5.19	5.40
		5	33.17 ± 1.98	89.00 ± 3.32	89.58 ± 2.56	93.08 ± 5.21	5.66	5.54	3.26	3.44	3.69
		32	23.30 ± 3.04	91.50 ± 2.19	97.58 ± 2.44	108.42 ± 9.44	5.66	5.36	3.42	3.50	4.32
		46	20.67 ± 1.21	60.90 ± 3.97	82.00 ± 7.07	101.58 ± 4.29	5.66	5.60	4.53	3.65	3.69
		81	25.42 ± 2.40	102.33 ± 3.32	103.90 ± 3.45	81.25 ± 7.00	5.66	5.49	3.18	3.37	3.61
	d-galactose	4	6.66 ± 1.91	87.66 ± 4.81	74.50 ± 3.90	53.08 ± 6.07	5.57	5.47	5.17	4.83	4.99
		5	12.92 ± 1.23	108.66 ± 4.74	78.00 ± 4.61	73.08 ± 2.38	5.57	5.40	5.01	4.44	5.02
		32	6.66 ± 1.30	105.50 ± 2.95	80.00 ± 2.02	78.25 ± 2.54	5.57	5.40	4.87	4.27	4.58
		46	12.83 ± 1.30	78.75 ± 2.85	68.42 ± 6.43	64.25 ± 2.65	5.57	5.42	5.23	4.57	4.39
		81	25.83 ± 3.80	128.33 ± 3.06	114.17 ± 4.82	102.83 ± 3.61	5.57	5.37	4.44	3.54	3.90
	d-xylose	4	37.58 ± 1.71	113.17 ± 4.75	114.83 ± 4.80	103.92 ± 5.36	5.68	5.46	4.51	4.37	4.72
		5	30.75 ± 3.09	109.25 ± 3.06	101.75 ± 6.31	89.16 ± 3.87	5.68	5.51	4.17	4.30	4.78
		32	37.92 ± 1.49	106.33 ± 1.79	113.25 ± 1.81	113.50 ± 3.18	5.63	5.45	3.89	3.45	3.56
		46	36.83 ± 2.18	89.50 ± 2.73	79.10 ± 2.88	65.80 ± 3.44	5.68	5.48	4.44	4.15	4.17
		81	34.75 ± 2.63	112.20 ± 6.90	115.10 ± 5.88	109.90 ± 2.94	5.68	5.49	3.62	3.66	4.60
	d-mannose	4	10.66 ± 1.20	47.50 ± 2.20	96.17 ± 5.92	69.60 ± 6.83	5.66	5.39	4.43	4.03	4.50
		5	31.50 ± 3.84	102.60 ± 4.14	76.80 ± 4.17	63.20 ± 4.87	5.66	5.34	3.84	4.10	4.73
		32	22.90 ± 2.10	87.75 ± 2.65	82.16 ± 4.35	80.10 ± 4.17	5.66	5.17	3.47	3.44	3.79
		46	14.00 ± 1.02	62.75 ± 3.72	67.75 ± 4.96	73.30 ± 4.71	5.66	5.35	3.90	3.89	4.71
		81	36.90 ± 2.37	100.50 ± 5.06	96.90 ± 3.65	86.70 ± 2.82	5.66	5.40	3.75	3.64	4.53

TABLE IV

Values of maximum growth (mycelium dry weight in mg) and days required to attain it (in brackets) of five isolates of « *Colletotrichum coccodes* » grown in presence of different carbohydrates.

Carbohydrate	Maximum growth of isolates				
	4	5	32	46	81
d-glucose	104.40 ± 3.92 (15)	78.30 ± 6.88 (15)	107.30 ± 10.32 (20)	97.35 ± 14.79 (10)	97.25 ± 7.11 (20)
d-levulose	126.45 ± 5.70 (10)	120.66 ± 3.24 (10)	104.95 ± 3.64 (10)	113.95 ± 4.21 (20)	51.05 ± 4.67 (20)
sucrose	77.70 ± 6.69 (15)	83.91 ± 2.00 (20)	84.91 ± 2.31 (20)	85.25 ± 3.37 (20)	101.41 ± 4.01 (10)
d-glucose + d-levulose	109.50 ± 9.57 (15)	99.92 ± 2.56 (20)	104.42 ± 3.68 (20)	95.16 ± 7.22 (15)	92.66 ± 1.91 (10)
l-arabinose	76.30 ± 8.73 (10)	93.08 ± 5.21 (10)	108.42 ± 9.44 (20)	101.58 ± 4.29 (20)	103.90 ± 3.45 (10)
d-galactose	87.66 ± 4.81 (10)	108.66 ± 4.74 (10)	105.50 ± 2.95 (10)	78.75 ± 2.85 (10)	128.33 ± 3.06 (10)
d-mannose	96.17 ± 5.92 (15)	102.60 ± 4.14 (10)	87.75 ± 2.65 (10)	73.30 ± 4.71 (10)	100.50 ± 5.06 (10)
d-xylose	114.83 ± 4.80 (10)	109.25 ± 3.06 (10)	113.50 ± 3.18 (15)	89.50 ± 2.73 (10)	115.10 ± 5.88 (10)

TABLE V

Relative maximum growth of 5 isolates of « *Colletotrichum coccodes* » in presence of different carbohydrates (value of isolate no. 4 in d-levulose = 100).

Carbohydrate	Relative maximum growth of isolates				
	4	5	32	46	81
d-glucose	82.56	61.92	84.77	76.98	76.91
d-levulose	100.00	95.42	82.99	90.11	40.37
sucrose	61.50	66.35	67.15	67.42	80.19
d-glucose + d-levulose	86.59	79.02	82.58	75.25	73.28
l-arabinose	60.34	73.61	85.74	80.33	80.92
d-galactose	69.32	85.93	83.43	62.27	101.48
d-mannose	90.80	86.40	89.90	70.78	91.40
d-xylose	70.50	82.90	69.40	58.00	79.60

of the behaviour of the five isolates towards the different carbohydrates tested (see Table VI). The following two differential behaviours are especially evident:

TABLE VI

Survey of the results of a statistical analysis concerning the behaviour of five isolates of « *Colletotrichum coccodes* » towards different carbohydrates. P. values: * .05; ** .01; *** .001.

Isolates	d-glucose	d-levulose	sucrose	l-arabinose	d-galactose	d-xylose	d-mannose	+ d-levulose d-glucose
4-5	**				*			
4-32		**		*	*			
4-46				*		***	*	
4-81		***	**	*	***			
5-32	*	**						*
5-46					***	***	***	
5-81		***	**		**			*
32-46					***	***	*	
32-81		***	**		***	***	*	*
46-81		***	**		***	**	**	

1) isolate no. 81 in presence of d-levulose, sucrose and d-galactose, and 2) isolate no. 46 in presence of d-xylose and d-mannose.

Other differences between isolates are manifested by a discoloration of the culture medium with the isolates no. 32 (yellow), 46 (red-brown) and 81 (pink in 5 out of 8 cases).

Whether a relation exists between physiological characteristics and virulence in the five strains studied is being investigated at present. Preliminary observations on artificial inoculation of ripe tomato fruits have demonstrated a clearly greater virulence in the strains no. 81, 46 and 32. Obviously, more fundamental differences between strain might be expected to result from investigations on the nitrogen metabolism and vitamin requirements of *Colletotrichum coccodes*. Investigations in this direction, in parallel with infection tests, are actually in progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Dr. C. M. MESSIAEN, Station de Pathologie Végétale, Montfavet, France, Dr. W. T. SCHROEDER, N. Y. State Agricultural Experiment Station,

Geneva, U.S.A. and Dr. J. C. WALKER, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, U.S.A. for providing the fungus cultures. He also very much appreciates the help and criticism of Professor F. D'AMATO, Director of the Institute.

REFERENCES

- ALLISON VAN BURGH P., 1952. — *Relation of solanine content of tomato fruits to colonization by Colletotrichum phomoides*. *Phytopathology*, **42**: 1.
- ARX VON J. A., 1957. — *Die Arten der Gattung Colletotrichum Cda*. *Phytopathologische Z.*, **29**: 413-468.
- BARNETT H. L., 1959. — *Plant Disease Resistance*. *Ann. Rev. Microbiology*, **13**: 191-210.
- BOONE D. M., KLINE D. M. and KEITT G. W., 1957. — *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. XIII. *Pathogenicity of induced biochemical mutants*. *Amer. Journ. Bot.*, **44**: 791-796.
- COCHRANE V. W., 1958. — *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons, Publishers, New York.
- GARBER E. D., 1960. — *The host as a growth medium*. *Ann. N. Y. Acad. Sciences*, **88**: 1187-1194.
- GOUGH F. J. and LILLY V. G., 1956. — *Growth rates and vitamin requirements of forty-four fungi*. *Proc. W. Va. Acad. Sci.*, **27**: 19-24.
- HUGHES S. J., 1958. — *Revisiones Hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis*. *Canadian Journ. Bot.*, **36**: 727-836.
- ILLMAN W. I., 1960. — *Anthracoze Disease of Tomato*. Thesis of the Faculty of Graduate Studies, University of Western Ontario, London, Canada: 1-143.
- KENDRICK T. W. and WALKER J. C., 1948. — *Anthracoze of tomato*. *Phytopathology*, **38**: 247-260.
- KENNETH T. W. and BEVENUE A., 1954. — *Vegetable Components-Some Carbohydrate Components of Tomato*. *J. Agric. Food Chemistry*, **2**: 472-474.
- LILLY V. G. and BARNETT H. L., 1956. — *The utilization of D- and L-arabinose by fungi*. *Amer. Journ. Bot.*, **43**: 709-714.
- PANTIDOU M. E. and SCHROEDER W. T., 1955. — *Foliage as a source of secondary inoculum for tomato anthracnose*. *Phytopathology*, **45**: 338-345.
- RAGHEB H. S. and FABIAN F. W., 1955. — *Growth and pectolytic activity of some tomato molds at different pH levels*. *Food Res.*, **20**: 614-625.
- SCHMITTHENNER A. F., 1952. — *Hydrolysis of pectin and cellulose by isolates of Colletotrichum phomoides, C. lagenarium, and Glomerella cingulata*. *Phytopathology*, **42**: 474.
- , 1953. — *The relationship of growth, pectolytic and cellulytic activity to pathogenic variation among isolates of Colletotrichum phomoides and related fruit rotting fungi*. Dissertation Abstr., The Ohio State University, **20**.
- SWANK G. Jr., 1950. — *Variation of monosporous isolates and reisolates of Colletotrichum phomoides*. *Phytopathology*, **40**: 27.
- , 1952. — *Variation of monosporous isolates of Colletotrichum phomoides*. Abstr. Doct. Dissert., The Ohio State University, **63**: 359-363.
- , 1953. — *The perfect stage of Colletotrichum phomoides on tomato*. *Phytopathology*, **43**: 285-287.

SUMMARY

The author has studied the influence of seven carbohydrates known to occur in the ripe tomato fruit and of a mixture of two of them on growth in *Colletotrichum coccodes*. For the investigation five monoconidial isolates from four cultures of different origin have been used. The carbohydrates were tested at identical carbon levels in a mineral medium

buffered at pH ca. 6.0 and mycelial growth was determined at intervals of 5 days after seeding.

It has been shown that the five isolates can all utilize the carbohydrates although at a different rate; maximum mycelium growth in each isolate requires different incubation times. In general, d-xylose, d-mannose and d-galactose are promptly utilized (10 days), whilst the remaining sugars and the mixture d-glucose + d-levulose are utilized more slowly. With d-galactose, and probably with d-mannose, a lag phase is observed.

As to the pH drop in the substrate during growth, it has been observed that pH drops to ca.3.0 in three strains, which appear to be more virulent on ripe tomato fruits. A discoloration of the medium has also been observed with the same three strains.

RIASSUNTO

Come parte di un programma di ricerche sui rapporti ospite-parassita nell'antracnosi del pomodoro, sono state svolte indagini sullo sviluppo dell'agente patogeno (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes) in coltura artificiale liquida in presenza di alcune sostanze carboidrate, componenti dei frutti di pomodoro, allo scopo di individuare le relazioni esistenti tra composizione dell'ospite e sviluppo e metabolismo dell'agente patogeno. Nel corso delle presenti ricerche sono stati impiegati 5 cloni monoconidici del patogeno, di diversa provenienza.

Le sostanze prese in esame sono state saccarosio, d-glucosio, d-levulosio, l-arabinosio, d-galattosio, d-xilosio, d-mannosio, impiegate nella concentrazione dell'1% da sole o in combinazione tra di loro, in un mezzo nutritivo minerale tamponato a pH 6. Lo sviluppo dei cloni è stato seguito nel corso dell'incubazione con esame dei prelievi effettuati a distanza di 5-10-15-20 giorni dalla semina, mediante determinazione del peso del micelio seccato a 80° C e del pH del mezzo nutritivo.

È stato osservato che i cloni utilizzano tutte le sostanze in esame, sebbene con diversa velocità; la produzione massima di micelio per ciascun clone richiede un diverso periodo di incubazione. In generale, d-xilosio, d-galattosio e d-mannosio vengono prontamente utilizzati (10 giorni), mentre i rimanenti carboidrati e la miscela d-glucosio + d-levulosio lo sono più lentamente; d-galattosio e d-mannosio determinano uno sviluppo ridotto nella prima fase a causa, probabilmente, della presenza di complessi enzimatici di adattamento capaci di convertire queste due sostanze in derivati fosforilati del glucosio.

Per quanto riguarda le variazioni del pH del substrato nutritivo, è stato notato che esso tende a diminuire per tre cloni trovati più virulenti su frutti di pomodoro. In questi stessi cloni è stata notata la presenza di prodotti metabolici capaci di colorare il mezzo nutritivo.



FORMAZIONE DI UN *FOLLICOLO* OVARICO E SUA FUNZIONE NELLA GENESI DELLE UOVA PARTENOGENETICHE IN *DAPHNIA MAGNA*

FULVIO ZAFFAGNINI

Istituto di Zoologia dell'Università, Bologna

*In Redazione: il 17 Luglio 1961**

INTRODUZIONE

Nel corso delle ricerche sull'ovogenesi dei Cladoceri, la mia attenzione è stata attratta dal comportamento di particolari cellule somatiche presenti nell'ovario. Scorrendo la bibliografia antica e recente non ho riscontrato che gli Autori precedenti avessero posto in risalto l'eventuale azione che queste potessero esplicare nella maturazione ovocitaria.

CLAUS (1876), SCHARFENBERG (1911), ma soprattutto WEISMANN (1877) hanno descritto la parete ovarica e le modificazioni funzionali che le sue cellule presentano durante l'ovogenesi sia partenogenetica che anfigonica. Recentemente però la REGGIANI (1954) ha affermato che non esistono nell'ovario di *Simocephalus vetulus* delle cellule somatiche avvolgenti gli ovociti o le cellule nutrici, per cui ho creduto opportuno riesaminare e studiare più a fondo il problema.

La specie prescelta è stata *Daphnia magna*, in cui la conoscenza della esatta successione dei vari momenti del processo ovogenetico e delle relative variazioni volumetriche (ZAFFAGNINI 1960), mi ha permesso di individuare in maniera sufficientemente esatta il comportamento e la funzione di queste cellule somatiche, mettendole in relazione con la maturazione dell'ovocita.

METODO

Gli esemplari femminili di *Daphnia magna*, tenuti a temperatura costante di 19° C, sono stati fissati ad intervalli di 12 ore, dalla nascita alla prima deposizione delle uova nella camera incubatrice, avvenuta a 6 giorni d'età. Il fissativo usato è stato il Serra, le sezioni di 5 o 7 μ sono state effettuate sia sagittalmente che frontalmente, mentre come metodi di colorazione sono stati adoperati Emallume-eosina, Feulgen e Verde di metile-pironina in soluzioni tamponate (GEROLA e VANNINI 1949).

* Lavoro eseguito con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

RISULTATI

Formazione del « follicolo » ovarico.

Alla nascita gli ovari sono costituiti da due cordoncini compatti di giovani ovociti non ancora visibilmente raggruppati in gruppi di quattro elementi. Essi sono posti ai lati dell'intestino, nella regione toracica, limitati da un sottile involucri con piccole e scarse cellule appiattite e poco visibili.

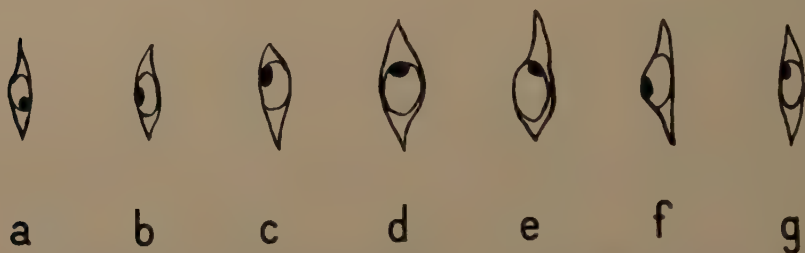


Fig. 1. — Modificazioni delle cellule del « follicolo » nel corso dell'accrescimento ovocitario: a) stadio in cui i gruppi germinali sono ben costituiti; b) stadio in cui l'ovocita è differenziato; c) stadio immediatamente precedente la vitellogenesi; d) stadio della piena vitellogenesi; e) stadio della vitellogenesi inoltrata; f, g) stadio in cui l'ovocita ha già riassorbito le proprie cellule nutrici. Ingr. 1000x.

Dopo il primo giorno, però, gli ovociti, ancora identici fra loro, sono riuniti in gruppi ben delineati, che si susseguono ordinatamente lungo l'ovario a partire dalla parte anteriore verso quella posteriore, dove è situato il germario; mentre le cellule della parete ovarica, sebbene ancora non molto numerose, si mostrano ora ben evidenti e di maggiori dimensioni. Esse presentano un nucleo ovoidale incolore, contenente piccoli granuli di cromatina Feulgen-positivi, disposti tutt'intorno lungo la membrana nucleare, ed un nucleolo Feulgen-negativo generalmente accostato anch'esso alla membrana nucleare; mentre il citoplasma è scarso, appiattito e basofilo, sovente allungato in sottili prolungamenti (Fig. 1, a). Il corpo centrale contenente il nucleo è quasi sempre situato negli interstizi fra un ovocita e l'altro (Fig. 2).

Successivamente uno dei quattro ovociti di ogni gruppo, generalmente il terzo a partire dal territorio germinale, incomincia ad accrescersi maggiormente di volume (ZAFFAGNINI 1960), circostanza che ci rivela come esso possieda delle caratteristiche che lo porteranno a divenire un uovo, mentre gli altri tre ovociti saranno destinati a funzionare come semplici cellule nutrici. Contemporaneamente si nota una produzione di cellule somatiche, derivate dalla parete ovarica, le quali si dispongono preferibilmente attorno all'ovocita di volume maggiore (Fig. 3).

Questa disposizione preferenziale si fa più evidente quando l'ovocita, visibilmente differenziato dalle proprie cellule nutritrici per la presenza di piccoli vacuoli in seno al suo citoplasma, tende a distendersi lungo la parete ovarica, cosicchè le cellule somatiche, che nel contempo hanno anche accresciuto le loro dimensioni (Fig. 1, *b*), seguono il contorno ovocitario raggruppandosi e disponendosi in fila compatta attorno ad esso (Fig. 4). Le cellule nutritrici invece non appaiono affiancate da questi elementi cellulari, anzi vengono progressivamente circondate dall'ovocita il cui grande incremento volumetrico e superficiale riduce al minimo i loro contatti con la parete ovarica. In genere le cellule nutritrici vengono spinte verso la parte superiore o mediana, ma laterale degli ovari, a lato o sotto i gruppi ovocitari dell'ovogenesi successiva, che avanzano e si differenziano esternamente e superiormente agli ovociti dell'ovogenesi precedente (Figg. 4 e 5).

Gli ovociti, perciò, si trovano inizialmente nella parte degli ovari più vicina all'intestino e successivamente, accrescendosi, tendono ad occupare le altre parti. Le cellule somatiche, insinuatesi fra i vari ovociti, li contornano lungo i loro margini liberi, cosicchè, in sezioni interessanti il solo ovocita, si vede che tali cellule lo circondano completamente, mentre in sezioni comprendenti anche le cellule nutritrici, esse si arrestano a livello di queste. Una simile disposizione è paragonabile ad una sorta di sacco cellulare non completamente chiuso, o « follicolo » incompleto, come l'ho chiamato nel mio lavoro citato, in cui ho descritto ed interpretato per la prima volta questa formazione cellulare (Fig. 6).

Col proseguire del processo ovogenetico, le cellule del « follicolo » continuano ad aumentare le proprie dimensioni, specialmente quelle del nucleo (Fig. 1, *c*). Quando l'ovocita entra in vitellogenesi esse presentano un nucleo ingrossato, vescicoloso, contenente addossati alla sua membrana il nucleolo pressochè immutato (alle volte due nucleoli in posizione opposta) e grossi granuli di cromatina (Fig. 1, *d*). Il voluminoso nucleo fa ernia sul citoplasma piatto ed allungato (che nel frattempo è divenuto meno basofilo) e conferisce alla fila di cellule un aspetto moniliforme (Fig. 7). L'ovocita, dal canto suo, estendendosi sempre più per l'aumento del proprio volume, tende a distanziare queste cellule le une dalle altre e, premendo contro di esse, ne accoglie la grossa parte nucleata in altrettante concavità del suo contorno (Fig. 8). Questo stretto contatto rende spesso invisibili i loro limiti cellulari, tanto che gli ovociti in vitellogenesi mostrano non di rado il proprio margine citoplasmatico tappezzato dai nuclei vescicolosi delle cellule del « follicolo » (Fig. 9).

Quando la vitellogenesi è pressochè compiuta e il citoplasma dell'ovocita si carica di grosse sferule di tuorlo, le cellule del « follicolo » si rarefanno e si impiccoliscono, sicchè attorno all'ovocita ormai maturo, che ha già riassorbito le proprie cellule nutritrici, si scorgono poche cellule di dimensioni ridotte, delle quali spesso è ben visibile solo il nucleo non più voluminoso (Fig. 1, *f* e *g*).

Questa rarefazione e questo impiccolimento delle cellule follicolari sono interpretabili come dovute ad un loro graduale riassorbimento da parte dell'ovocita, il quale perciò, insieme alle proprie cellule nutrici, provvede ad utilizzare anche le cellule che lo hanno contornato e seguito per tutto il periodo della sua maturazione. Infatti, dopo la deposizione delle uova nella camera incubatrice, non è possibile trovare nell'ovario nessuna cellula che sia riferibile al primitivo « follicolo ».

Invece, fra i gruppi ovocitari della seconda ovogenesi, che nel loro avanzamento avevano da tempo raggiunto l'estremità anteriore dell'ovario, e che ora vengono a trovarsi in uno spazio molto ampio che non riescono ad occupare completamente, si notano delle cellule il cui aspetto è completamente diverso da quello delle cellule follicolari. Esse hanno un citoplasma ridotto per lo più a sottili e lunghi prolungamenti, scarsamente basofilo, ed un nucleo tondeggianti, di media grandezza, contenente pochi granuli di cromatina e un nucleolo per lo più centrale (Fig. 10). I prolungamenti citoplasmatici uniti fra loro formano una sorta di graticcio e lo spazio compreso fra le maglie del reticolo è stato interpretato da WEISMANN (1877) come vescicole trasparenti formanti un « tessuto vescicoloso ».

Questo tessuto, secondo WEISMANN, è costituito dalle cellule dell'epitelio ovarico, le quali, specialmente dopo la deposizione delle uova nella camera incubatrice, perdono le loro piccole dimensioni e il loro aspetto allungato e si rigonfiano in grosse trasparenti vescicole. Egli attribuisce al « tessuto vescicoloso » una funzione eminentemente trofica, ammettendo che le cellule epiteliali si imbevano di plasma sanguigno e lo cedano poi alle cellule germinali in maturazione. Quando gli ovociti sono ormai maturi e riempiono completamente l'ovario, le cellule epiteliali perdono il loro aspetto vescicoloso e si ammassano negli spazi compresi fra i vari ovociti, salvo ad imbevversi di nuovo di liquido non appena cessa la pressione che su di esse veniva esercitata.

Non è qui il caso di discutere sulla autentica natura di questo « tessuto ».

Fig. 2. — Le cellule della parete ovarica sono localizzate negli spazi compresi fra i gruppi ovocitari ben costituiti. Sez. sagittale (parte ventrale a destra). Verde di metile pironina a pH 9. Ingr. 670×.

Fig. 3. — Ovocita non ancora morfologicamente ben differenziato, attorniato da una fila compatta di cellule appiattite. Sez. frontale (intestino a destra). Emallume-eosina. Ingr. 670×.

Fig. 4. — Ovocita vacuolizzato, contornato da numerose cellule appiattite. Sez. sagittale (parte ventrale a destra). Verde di metile-pironina a pH 9. Ingr. 560×.

Fig. 5. — Ovocita in avanzata vitellogenesi, che circonda quasi completamente una cellula nutrice. A destra di questa si vede il primo gruppo germinale della seconda ovogenesi, il cui ovocita già differenziato è affiancato da una fila di cellule appiattite. A sinistra dell'ovocita in vitellogenesi è visibile la parete intestinale. Sez. frontale. Verde di metile-pironina a pH 9,5. Ingr. 450×.

N. B. — Il germario è situato sempre in basso delle figure.



vescicoloso », osservato anche da altri Autori, per la cui descrizione particolareggiata rimando al lavoro di WEISMANN; ma a me preme sottolineare la completa differenza che esiste, a mio avviso, sia nel comportamento che nel destino, e che da quanto esposto risulta abbastanza evidente, fra le cellule dell'epitelio ovarico e quelle del « follicolo » (Fig. 11).

Gli ovociti della seconda ovogenesi, prodotti successivamente dal germario, man mano che procedono cefalicamente nell'ovario e si differenziano a lato di quelli in vitellogenesi della prima ovogenesi, appaiono affiancati da una fila compatta di nuove cellule appiattite, le quali subiranno le stesse modificazioni di quelle legate agli ovociti della prima ovogenesi (Fig. 5). Il ripetersi di questi fenomeni ad ogni attività ovogenetica ci indica che vi è una periodica produzione di cellule somatiche collegate con la maturazione dell'ovocita.

Il fatto, infine, che esse nella prima ovogenesi appaiano attorno agli ovociti lungo tutto l'ovario e nelle successive compaiono invece appena gli ovociti lasciano il germario, seguendoli durante la loro migrazione in seno all'ovario, ci induce a ritenere che inizialmente la capacità di produrre queste cellule sia estesa a tutta la parete ovarica e che in seguito essa sia limitata ad una particolare riserva di cellule somatiche situata nel territorio germinale.

Significato ed attività delle cellule del « follicolo ».

WEISMANN, nel lavoro citato, aveva già parlato nei Dafnoidi ⁽¹⁾ della formazione più o meno evidente di camere cellulari aperte, racchiudenti ognuna un gruppo germinale e derivate dal ripiegamento del sottile involucri ovarico fra i singoli gruppi germinali in maturazione, senza che avvenisse una reale formazione di follicoli con strato epiteliale chiuso. Questo Autore quindi identifica il « follicolo » ovulare con l'epitelio ovarico e non attribuisce ad esso nessuna importanza funzionale, considerando le sparse, piccole cellule allungate che lo costituiscono come un riempitivo degli spazi compresi fra i vari gruppi ovocitari. Solo quando le cellule dell'epitelio si rigonfiano in grosse vescicole, costi-

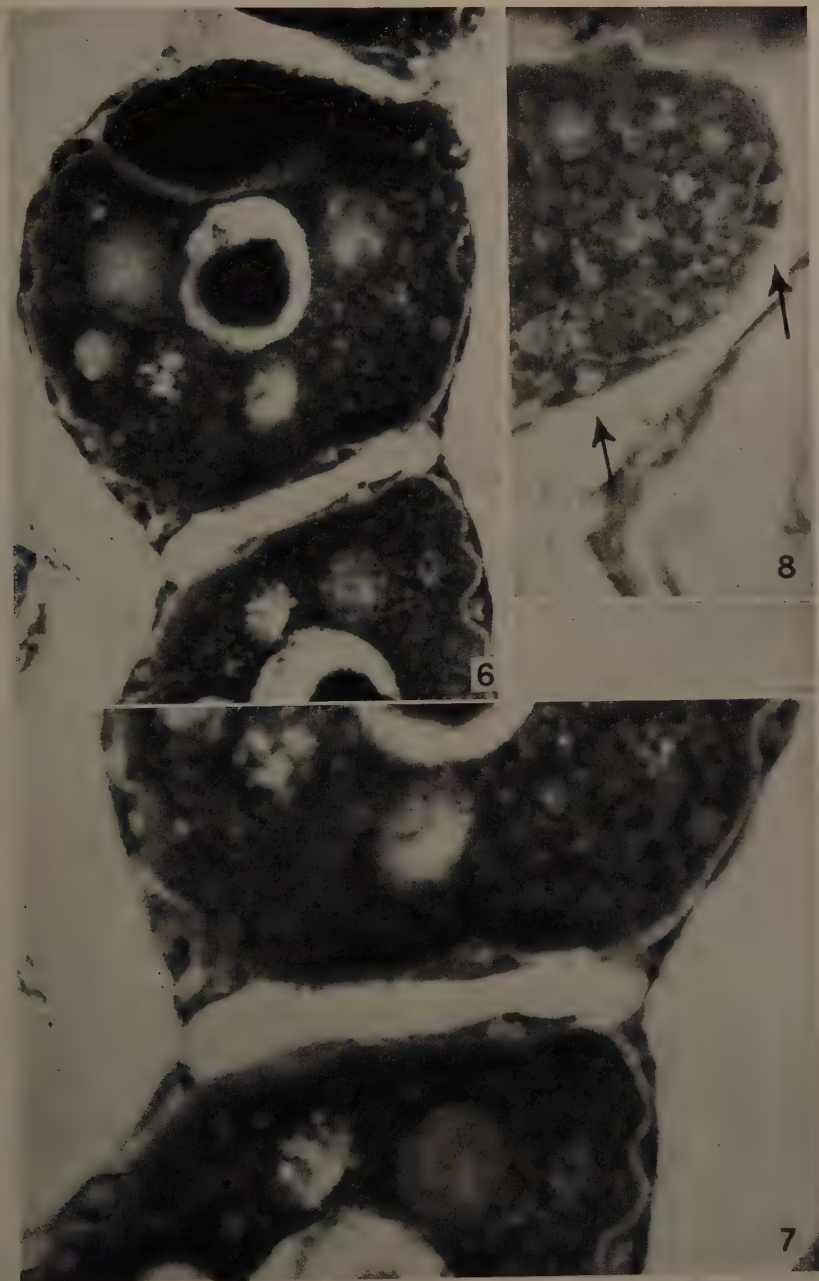
(1) WEISMANN comprende nel termine Dafnoidi tutti i Cladoceri; io invece mi riferisco alla sola famiglia dei Dafnidi, di cui ho più diretta conoscenza.

Fig. 6. — Ovocita in vitellogenesi circondato dalle cellule ingrossate del « follicolo ». Sez. sagittale (parte ventrale a destra). Verde di metile-pironina a pH 10. Ingr. 670×.

Fig. 7. — Particolare della figura precedente. Il voluminoso nucleo delle cellule follicolari fa da barriera sul contorno ovocitario. Notare il citoplasma sottile e il nucleolo eccentrico. Ingr. 1055×.

Fig. 8. — Porzione di ovocita in piena vitellogenesi con due cellule follicolari insinuate nel margine ovocitario. Sez. sagittale (parte ventrale a sinistra). Verde di metile-pironina a pH 11. Ingr. 670×.

N. B. — Il germario è situato sempre in basso delle figure.



tuendo il cosiddetto « tessuto vescicoloso », esse acquisterebbero l'importante funzione trofica.

A mio avviso, invece, le cellule del « follicolo », come ho già fatto notare, hanno una propria specifica funzione e individualità, che le distingue per comportamento e attività da quelle costituenti l'epitelio ovarico, sia nel suo aspetto normale che vescicoloso. Infatti, mentre queste rivolgono la loro azione distintamente verso tutti gli elementi germinali, le cellule follicolari, presenti solo attorno all'ovocita, esplicano la loro attività solo verso di esso, collegando il loro ciclo vitale (accrescimento, riduzione e scomparsa) con la maturazione ovocitaria. Quale possa essere questa attività risulterà chiaro dalle considerazioni che seguono.

La circostanza che ovocita e cellule nutritrici derivino da un gruppo di quattro elementi germinali non presentanti inizialmente nessun carattere che li possa distinguere, e che ad un certo punto uno di essi, generalmente il terzo, si differenzi in ovocita, prima aumentando maggiormente di volume e poi presentando dei vacuoli, in concomitanza ad una produzione di cellule somatiche, le quali si ammassano attorno all'elemento germinale differenziandosi, ci ha indotto ad attribuire a queste cellule l'importante ruolo di differenziatori ovocitari. Il loro citoplasma scarso ed allungato e lo stretto contatto che esse presentano con la superficie dell'ovocita, ci fanno pensare che queste cellule cedano continuamente a quest'ultimo delle sostanze atte a potenziarne il metabolismo, come ad esempio gli acidi ribonucleici.

Infatti le cellule del « follicolo » rivelano, con la colorazione verde di metile-pironina in soluzioni tamponate, che mentre il nucleolo rimane abbastanza ricco in ribonucleoproteine durante tutto il processo ovogenetico, il citoplasma tende a diminuire il proprio contenuto ribonucleoproteico, presentando a pH 9 un colore che, nelle fasi successive dello sviluppo dell'ovocita, va dal viola, al viola-bluastro, al blu e infine al verde. Questo graduale passaggio dal-

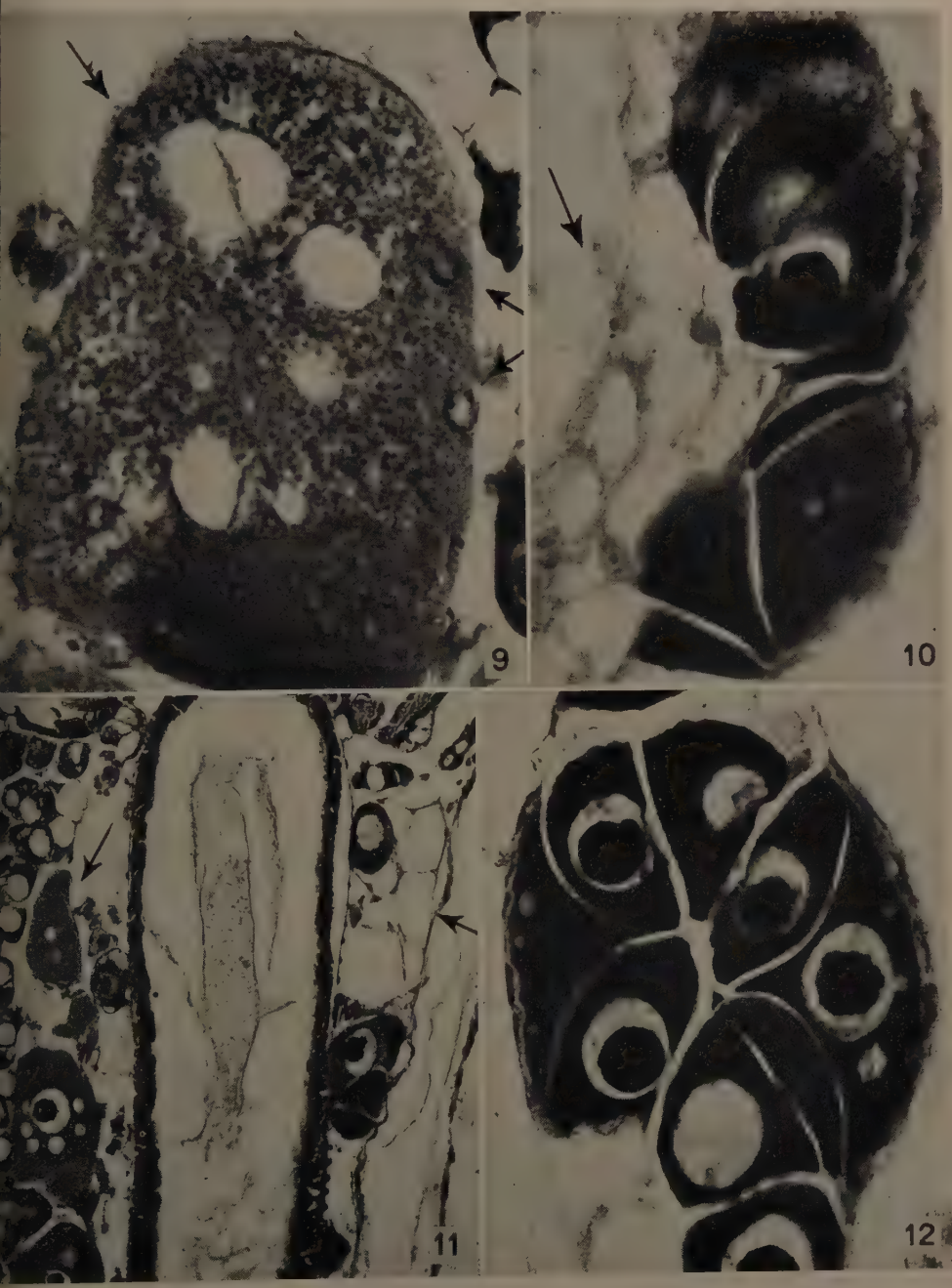
Fig. 9. — Ovocita in vitellogenesi, che mostra sul proprio margine vari nuclei vescicolosi delle cellule del « follicolo ». I limiti cellulari non sono visibili. Sez. frontale (intestino a sinistra). Emallume-eosina. Ingr. 670 \times .

Fig. 10. — Cellule reticolate dell'involucro ovarico costituenti il cosiddetto « tessuto vescicoloso ». Notare il nucleo tondeggiante e il nucleolo centrale. Sono sfuocate le cellule follicolari a lato degli ovociti. Sez. sagittale (parte ventrale a destra). Verde di metile-pironina a pH 10. Ingr. 505 \times .

Fig. 11. — Parte anteriore degli ovari visti in sezione frontale: a destra dell'intestino vi è una porzione reticolata dell'ovario attribuibile al « tessuto vescicoloso » e a sinistra un ovocita attorniato dalle cellule del « follicolo ». Notare la differenza fra i due tipi di cellule. Emallume-eosina. Ingr. 185 \times .

Fig. 12. — Due gruppi ovocitari affiancati: in quello di destra l'ovocita deriva dalla terza cellula germinale; in quello di sinistra dalla seconda. I due ovociti sono contornati dalle cellule follicolari. Sez. frontale (intestino a destra). Verde di metile-pironina a pH 9. Ingr. 505 \times .

N. B. — Il germario è situato sempre in basso delle figure.



l'affinità per la pironina verso quella per il verde di metile ripete in maniera molto simile le variazioni di colorazione che gli ovociti presentano nel corso della loro maturazione, quasi che l'impoverimento in materiale ribonucleoproteico avvenga in modo parallelo nelle cellule follicolari e nell'ovocita in maturazione. Tale somiglianza di colorazione, anche se può essere in parte attribuita ad un mascheramento della colorabilità propria delle cellule follicolari, dato il loro scarso citoplasma, da parte degli ovociti, è senza dubbio indice della stretta relazione esistente fra i due tipi cellulari.

Tutte queste osservazioni concordano nel farci ammettere che le cellule del « follicolo » stimolino nell'elemento destinato a maturare in ovocita una maggiore attività metabolica, che ha come sua prima manifestazione l'aumento volumetrico. Le cellule nutrici, invece, prive del contatto di queste cellule e quindi delle sostanze che esse cedono, seguono un accrescimento più modesto e si comportano come cellule germinali abortive: raggiunto un determinato grado di sviluppo incominciano a cedere parte del loro contenuto.

L'azione delle cellule follicolari continua e si intensifica con il proseguire del processo ovogenetico, fino a farsi di nuovo preminente quando l'ovocita poco dopo l'inizio dell'attività nutrice, entra in vitellogenesi. Queste cellule che presentano ora un nucleo vescicolare, stimolano nell'ovocita l'utilizzazione del materiale ribonucleoproteico accumulato nel citoplasma e quello ceduto dalle cellule nutrici, per l'elaborazione dei primi granuli di tuorlo. Esse cioè intervengono ad attivare più fortemente ancora il metabolismo dell'ovocita, che mostra pertanto un considerevole aumento volumetrico attestato dalla velocità di ascesa della curva di accrescimento. Questa attività si prolunga per tutto il periodo vitellogenetico e il particolare aspetto delle cellule follicolari e il loro insinuarsi nel margine ovocitario fin quasi a scomparire in esso conferma la validità della nostra interpretazione. Quando le ribonucleoproteine sono quasi completamente esaurite e il tuorlo è pressoché formato, le cellule del « follicolo », giunte al termine della loro attività, si rarefanno, si impiccoliscono e infine scompaiono.

Una ulteriore prova dell'importanza delle cellule del « follicolo » nel processo ovogenetico in generale e nella vitellogenesi in particolare è il fatto che le cellule nutrici, pur nelle oscillazioni dei loro volumi determinate dalle periodiche cessioni di materiale nutritizio all'ovocita, riescono a raggiungere, ma non ad oltrepassare, il volume che questo aveva prima di ricevere materiale ribonucleoproteico ed entrare in vitellogenesi. Evidentemente il volume raggiunto dall'ovocita prima della vitellogenesi corrisponde ad un periodo critico che soltanto l'elevata attività metabolica indotta dalle cellule follicolari, unita ad un abbondante nutrimento, riesce a far superare con la produzione delle sostanze di riserva. Per contro, con il forte aumento del volume ovocitario, le cellule nutrici vengono a trovarsi sempre più circondate, sicché, raggiunto il

loro massimo accrescimento, private di sufficienti scambi metabolici con l'esterno e quindi di nutrimento, regrediscono fino a dissolversi del tutto a favore dell'ovocita.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

WEISMANN, nel lavoro citato, ha affermato che delle quattro cellule germinali costituenti il gruppo, quella che ha raggiunto un più elevato grado di sviluppo rispetto alle altre si trasforma in ovocita, per il fatto che essa, per il suo metabolismo più intenso, diviene un centro di attrazione più elevato, al quale affluiscono più abbondantemente le sostanze nutritive. Al contrario, il minor sviluppo delle cellule nutrici risiede nel loro metabolismo più lento e la loro dissoluzione finale nel fatto che esse hanno raggiunto la loro massima capacità di accrescimento, alla quale si aggiunge l'arresto del loro nutrimento.

Queste affermazioni coincidono in sostanza con le mie conclusioni, soltanto che WEISMANN non ha indicato quali siano gli agenti che inducono nell'ovocita una più intensa attività metabolica. Essi sono, a mio avviso, le cellule del « follicolo », la cui presenza od assenza risulta determinante, da quanto ho ora esposto, nella differenziazione delle cellule dei gruppi germinali in ovociti o in cellule nutrici.

« La decisione poi — dice WEISMANN — su quale delle quattro cellule debba divenire l'uovo, non dipende soltanto dalle condizioni di accrescimento relative alle stesse, che si attuino di volta in volta, ma anche dall'abitudine della terza cellula, tramandatasi per una lunga serie di generazioni, a divenire cellula uovo ». In altre parole, « si può ammettere che l'attitudine della terza cellula dei gruppi germinali a divenire un uovo non risieda soltanto nella superiorità di questa cellula, ogni singola volta verificatasi ex novo, ma in una predisposizione all'ovogenesi ormai fissata da moltissime generazioni in maniera ereditaria. Il più rapido accrescimento e il più energico metabolismo di questa cellula, a causa della sede favorevole, verrebbero così a costituire solo le cause ultime, alle quali è riconducibile la sua attuale superiorità. Esattamente le stesse considerazioni — conclude WEISMANN — si possono fare per le tre cellule nutrici; anche qui si tratterebbe della fissazione ereditaria di un orientamento divenuto per lungo tempo abituale ».

Io non so fino a che punto l'interpretazione di WEISMANN possa ritenersi valida, tuttavia a me sembra che la posizione centrale favorevole sia la causa principale per cui il terzo elemento di ogni gruppo, primo fra tutti, si mette a contatto con le cellule del « follicolo » e si evolve conseguentemente in ovocita. D'altronde la circostanza che alle volte invece del terzo diviene uovo il secondo elemento, mai il primo o il quarto, parla in favore dell'interpretazione puramente topografica del fenomeno (Fig. 12). E per spiegare perchè questa seconda eve-

nienza è più rara, non si può escludere che, come dice WEISMANN, originariamente abbia avuto luogo una competizione fra seconda e terza cellula, vinta a poco a poco da quest'ultima.

La presenza e il comportamento delle cellule del « follicolo » sono stati da me riscontrati anche in *Simocephalus*, per cui si può pensare che questo « follicolo » incompleto, presente in tutti i Dafnidi, come d'altronde è stato rilevato anche da WEISMANN, espliciti in essi la medesima attività osservata in *Daphnia*. WEISMANN (1874) stesso però riferisce che in *Leptodora* si originano delle camere ovulari in modo simile a come accade negli ovaroli degli Insetti, vale a dire si formerebbero dei follicoli chiusi. Ciò solleva dei problemi molto interessanti sull'evoluzione dell'ovogenesi nei Cladoceri, e particolare importanza rivestirebbe, sotto questo punto di vista, lo studio dell'ovogenesi nei Sididi, che costituiscono un gruppo di Cladoceri molto primitivi.

BIBLIOGRAFIA

- CLAUS C., 1876. — Zur Kenntnis der Organisation und des feineren Baues der Daphniden und verwandter Cladoceren. Zeitschr. Wiss. Zool., **27**: 362-402.
- GEROLA F. M. e VANNINI E., 1949. — La colorazione con verde di metile-pironina in mezzo tamponato nella ricerca degli acidi ribonucleici. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., **25**: 644-646.
- REGGIANI M. P., 1954. — Osservazioni preliminari sul comportamento del nucleolo e delle ribonucleoproteine negli ovociti e nelle cellule nutritive di *Simocephalus vetulus* (Cladocera-Daphnidae). Rend. Accad. Naz. Lincei, Ser. VIII, **17**: 124-132.
- SCHARFENBERG U. (von), 1911. — Studien und Experimente über die Eibildung und den Generationszyklus von *Daphnia magna*. Intern. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrog., **3**: (Suppl.): 1-42.
- WEISMANN A., 1874. — Ueber Bau und Lebenserscheinungen von *Leptodora hyalina*. Z. Wiss. Zool., **24**: 349-418.
- , 1877. — Beiträge zur Naturgeschichte der Daphnoiden. II, III, IV. Z. Wiss. Zool., **28**: 93-254.
- ZAFFAGNINI F., 1960. — Osservazioni morfologiche e citometriche sulla genesi delle uova partenogenetiche in *Daphnia magna*. I parte. Arch. Zool. Ital., **45**: 125-158.
- , 1961. — Comportamento e attività delle cellule della parete ovarica nell'ovogenesi partenogenetica in *Daphnia magna*. Boll. Zool. (in corso di stampa).

SUMMARY

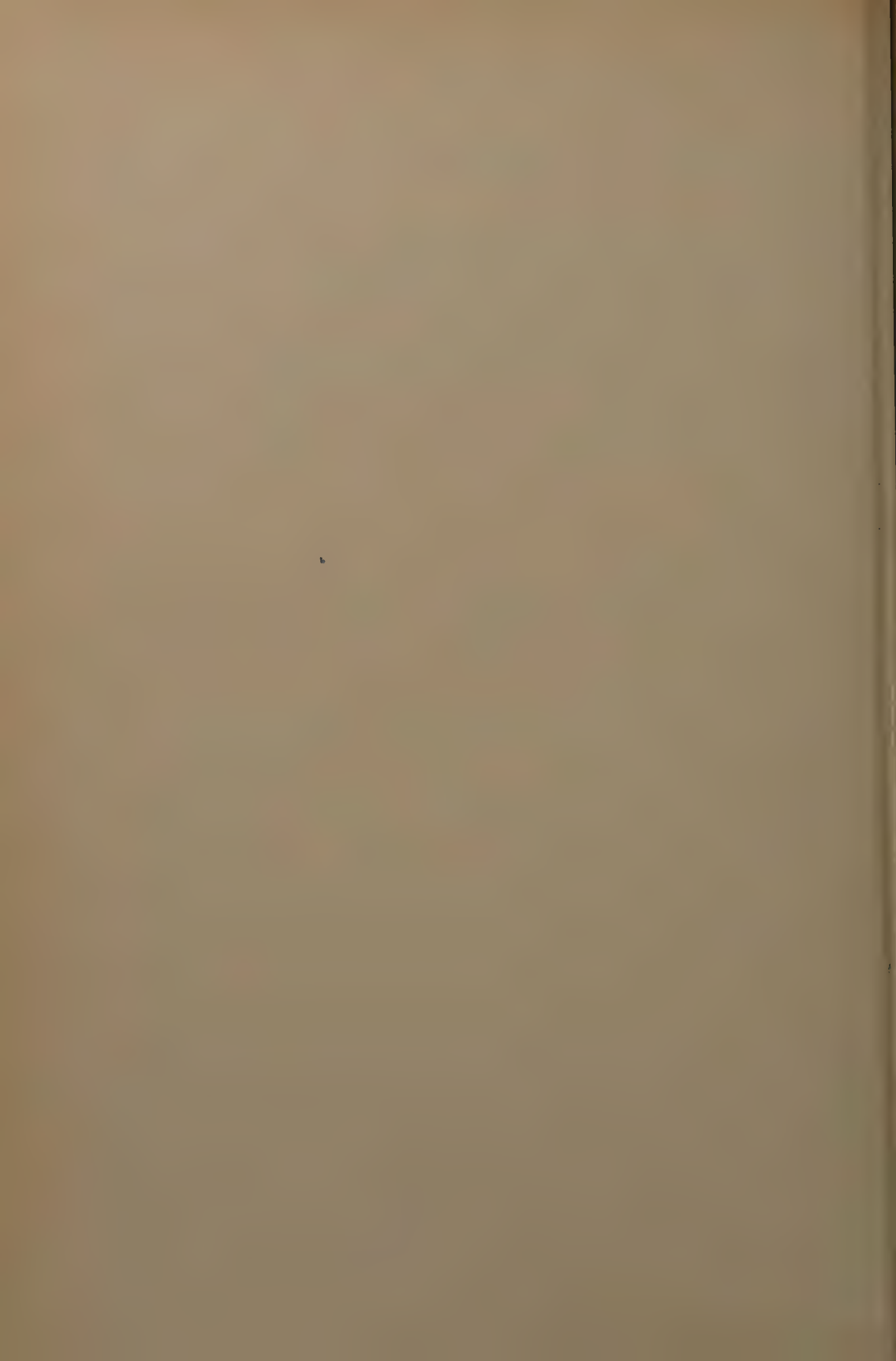
In the genesis of parthenogenetic eggs of *Daphnia magna*, somatic cells are produced, which surround only one of the four regrouped oocytes, constituting a sort of incomplete "follicle". This oocyte (generally the third), surrounded by the follicle cells, reveals a greater metabolism, grows more and becomes egg, while the other three oocytes, lacking in the follicle cells, grow less, are unable to elaborate yolk and deliver their contents to the definitive oocyte, becoming nurse cells. Therefore we admit that the follicle cells play a determining role in the oocyte differentiation and in the vitellogenesis by inducing a great metabolic activity.

The reason for which only the third cell of every group (sometimes the second) generally becomes oocyte almost exclusively depends by its central favourable position.

RIASSUNTO

Nella genesi delle uova partenogenetiche in *Daphnia magna*, vengono prodotte delle particolari cellule somatiche, le quali si dispongono solo attorno ad uno dei quattro ovociti raggruppati, formando una sorta di « follicolo » incompleto. Questo ovocita (generalmente il terzo), attorniato dalle cellule follicolari, presenta un maggiore metabolismo, si accresce di più e diviene un uovo, mentre gli altri tre, privi di queste cellule, raggiungono un minor grado di accrescimento, sono incapaci di elaborare tuorlo e cedono il loro contenuto all'ovocita definitivo, funzionando come cellule nutritive. Pertanto si ammette che le cellule del « follicolo » esplicano un ruolo importante nel differenziamento dell'ovocita e nella successiva genesi del tuorlo inducendo in questo una elevata attività metabolica.

Il motivo per cui generalmente solo la terza cellula di ogni gruppo (alle volte la seconda) evolve in ovocita è da attribuirsi quasi esclusivamente alla sua posizione centrale favorevole.



CYTOLOGY OF *DENNSTAEDTIA HIRSUTA* AND ITS BEARING ON EVOLUTION IN FERNS

S. C. VERMA and SIRO KURITA

Botany Department, Panjab University, Chandigarh, India, and No. 244, Horinouchi, Kikugawa, Ogasa-Gun, Shizuoka, Japan.

Received: 17th June 1961

The fern genus *Dennstaedtia* occupies a pivotal position in the phyletic series of leptosporangiate ferns and the significance attached to it varies in different systems of classification. Based on morphology, BOWER (1926, 1928) recognised the relationship of his *Dennstaedtiinae* to *Dicksonioids* on one hand, and *Davallioids* and *Pteroids* on the other, thus itself representing a transitional series; while the prime source being the Schizaceous stock. CHING (1940) derived his *Pteroid-Gymnogrammoid* series and *Lindsayoid-Davallioid* series from the *Dicksonioid* stock, the family *Dennstaedtiaceae* being in the latter series. COPELAND (1947) discusses at length in his comprehensive family *Pteridaceae* about the *Dennstaedtioid* ferns as a possible ancestry for *Pteris*, and to be more exact he even attempts to suggest a possible link between *Dennstaedtia* and *Pteris*. HOLTUM's (1947, 1949) scheme is rather more explicitly phyletic than others and in his view the genus *Dennstaedtia* conforms most nearly to the hypothetical primitive ancestor for the great majority of 'Polypodiaceous' leptosporangiate ferns. The common feature in all the above treatments lies in the general recognition (except perhaps CHING 1940) of a possible direct relation between *Dennstaedtia* (or like ancestors) and *Pteroids* (or *Pteris*).

The impact of the recent evidence of chromosome numbers in fern phylogeny is evident from the recent systems of ALSTON (1956), PICI-SERMOLLI (1958, 1959), and MEHRA (1961). MANTON and SLEDGE (1954) initiated the bearing of cytology on the taxonomic systems and in particular discussed that of COPELAND (1947), while later MANTON (1958) focussed her attention on COPELAND's *Pteridaceae* which exhibits a marked discontinuity in cytology in genera placed above *Pteris* (cf. Tables I and II in MANTON 1958), apparently indicating the removal of the genera from *Pteris* and onwards ($x = 29, 30$) into a distinct family. This was so suggested cautiously by MANTON (1958), since even this assemblage may require further segregation on a morphological bias. But, probably, the earlier comments of MANTON and SLEDGE (1954) about the cytological discontinuity in COPELAND's *Pteridaceae* are significant, wherein they had suggested instead a deeper probe into the supposedly more primitive members in the family, especially the key genus *Dennstaedtia* and the intermediate genera *Microlepia* and *Schizoloma*,

since they might 'contain additional elements (cytological) which might perhaps bridge the gap towards *Pteris*'.

The preceding account points to the exceptional interest attached to the earlier members in COPELAND's Pteridaceae, especially *Dennstaedtia*. In an attempt to compare the cytological evolution of Himalayan ferns with the Japanese ones by the writers, the Japanese *Dennstaedtia hirsuta* (Sw.) Mett. (cf. TAGAWA 1959) gathered from Hamaoka (138°10' E, 34°40' N) has yielded results of far reaching significance. The haploid chromosome complement comes out to be unequivocally 30 (Fig. 1). The species shows absolutely normal meiosis with the usual output of 64 seemingly viable spores per sporangium.

DISCUSSION

The two Himalayan species in *Dennstaedtia*, *D. appendiculata* (Wall.) J. Sm. ($n = 66$) and *D. scabra* (Wall.) Moore ($n = 66$) are reported earlier by MEHRA and KHANNA (1959). The only other reports in the genus concern a Canadian species *D. punctilobula* (Mich.) Moore ($n = 34 \pm 1$) investigated by BRITTON (1953), *D. scabra* from Ceylon ($n = 64-65$) and *D. cicutaria* (Sw.) Moore, an American species growing at Kew, ($n = 94$), both reported by MANTON and SLEDGE (1954). The presence of $n = 30$ in Japanese *D. hirsuta* strongly points to the diversity of chromosome numbers in the genus which in itself is suggestive of great antiquity and the urgency to find additional morphological criteria to a possible segregation of the genus. The inclusion of such diverse cytological elements (perhaps more) in *Dennstaedtia* is likely to be one of the several cases of convergent evolution in ferns. But more important than this is the conclusion that the Dennstaedtioid stock is characterised by diverse base numbers and there seems every likelihood of their being ancestral to most of the modern leptosporangiates as proposed by HOLTUM (1947, 1949). Recently, however, MEHRA (1961) finds the major objection against HOLTUM's comprehensive family Dennstaedtiaceae in its inclusion of cytologically unrelated elements and thus finds no relation between the Dennstaedtioids and Pteroids, particularly with regard to cytology. Nevertheless, if cytological evidence is required to bridge the gap between *Dennstaedtia* and Pteroids (or possibly *Pteris*), it is now present in *Dennstaedtia hirsuta* ($n = 30$). The latter is also a point in favour, in a cytological sense, in its Schizaeoid affinity (cf. *Lygodium*, $n = 29, 30$; MANTON and SLEDGE 1954). Evidently a cytological evidence exists for a possible relationship between Schizaeaceae, *Dennstaedtia* (or Dennstaedtiaceae) and Pteroids, a view strictly held by BOWER (1926, 1928) and COPELAND (1947), also partly by others.

All the same, we quite agree with MANTON (1958) about the limited application of the cytological results and when used alone, could be as misleading as any other morphological criterion since a hypothetical probability exists in



Fig. 1. — Meiotic metaphase I of *Dennstaedtia hirsuta* (Sw.) Mett., $n = 30$. $\times 2000$. Material collected in wild condition from Hamaoka (138°, 10' E, 34°. 40' N.), 10 m. alt.

the resynthesis of various numerical numbers during such a long history. Hence, we propose that emphasis should be laid on comparative morphology in the phylesis of larger groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

The writers are very grateful to Dr. M. TAGAWA, Dr. H. ITO, and Kew authorities for authentication of the specimen. The senior author wishes to express his deep gratitude to Prof. P. N. MEHRA (Chandigarh) for encouragement.

REFERENCES

- ALSTON A. H. G., 1956. — *The subdivision of the Polypodiaceae*. Taxon, **5**: 23-25.
 BRITTON D. M., 1953. — *Chromosome studies on ferns*. Am. Jour. Bot., **40**: 575-583.
 BOWER F. O., 1926. — *The Ferns*. Vol. II., Camb. U. Pr.
 —, 1928. — *The Ferns*. Vol. III., Camb. U. Pr.
 CHING R. C., 1940. — *On natural classification of the family Polypodiaceae*. Sunyatsenia, **5**: 201-269.
 COPELAND E. B., 1947. — *Genera Filicum*. Chron. Bot. Walth. Mass., U.S.A.
 HOLTTUM R. E., 1947. — *A revised classification of Leptosporangiate ferns*. Jour. Linn. Soc. (Bot.), **53**: 123-158.
 —, 1949. — *The classification of ferns*. Biol. Rev., **24**: 267-296.
 MANTON I., 1958. — *Chromosomes and Fern phylogeny with special reference to "Pteridaceae"*. Jour. Linn. Soc. (Bot.), **56**: 73-92.
 MANTON I. and SLEDGE W. A., 1954. — *Observations on the cytology and taxonomy of the Pteridophyte Flora of Ceylon*. Phil. Tr. R. Soc. London, Ser. B., n. 654, **238**: 127-185.
 MEHRA P. N., 1961. — *Cytological evolution of Ferns with particular reference to Himalayan forms. (Presidential address)*. Proc. 48th session Ind. Sci. Congr., Rooskee, Part II: 130-153.
 MEHRA P. N. and KHANNA K. R., 1959. — *Cytology of some Himalayan Ferns*. Jour. Genetics, **56**: 1-14.
 PICHI-SERMOLLI R. E. G., 1958. — *The higher taxa of the Pteridophyta and their classification*. In: "Systematics of Today" edited by O. HEDBERG. Uppsala Univ. Arsskrift, pp. 70-90.
 —, 1959. — *Pteridophyta*. In: "Vistas in Botany" edited by W. B. TURRILL, Pergamon Press Ltd. London, pp. 421-493.
 TAGAWA M., 1959. — *Coloured Illustrations of Japanese Pteridophyta*. Hoikusha, Osaka, Japan.

SUMMARY

Dennstaedtia holds a pivotal position in the phylesis of leptosporangiate ferns, as evidenced from different systems of classification especially proposed by HOLTTUM (1947, 1949). There exists presently a great controversy about a possible relation between *Dennstaedtia* and Pteroids, previously held by BOWER (1926), COPELAND (1947) and HOLTTUM (l. c.). The major objection concerns the cytological discontinuity between *Dennstaedtia* and Pteroids (cf. MANTON and SLEDGE 1954; MANTON 1958; MEHRA 1961). The present report of $n = 30$ in Japanese *Dennstaedtia hirsuta* (Sw.) Mett. possibly bridges the gap, in a cytological sense, towards *Pteris*. Nevertheless, it is pointed out that in the phylesis of larger groups emphasis must be laid on comparative morphology.

RIASSUNTO

Il genere *Dennstaedtia* occupa una posizione chiave nella filogenesi delle felci leptorangiate, come è messo in evidenza da differenti sistemi di classificazione proposti da HOLTUM (1947, 1949). Al momento vi è una forte controversia circa una possibile relazione tra *Dennstaedtia* e le Pteridi già sostenuta da BOWER (1926), COPELAND (1947) e HOLTUM (1949). L'obiezione maggiore è costituita dalla discontinuità citologica tra *Dennstaedtia* e le Pteridi (cf. MANTON e SLEDGE 1954, MANTON 1958 e MEHRA 1961). Il numero $n = 30$ trovato nell'esemplare giapponese di *Dennstaedtia hirsuta* (Sw.) Mett., riportato nel presente lavoro, forse colma dal lato citologico la distanza da *Pteris*. Viene tuttavia messo in evidenza che nella filogenesi di gruppi più vasti deve essere data un'importanza particolare alla morfologia comparata.



CHROMOSOME BREAKAGE BY PYRROLIZIDINE ALKALOIDS AND MODIFICATION OF THE EFFECT BY CYSTEINE

SILVANA AVANZI

Centro Studi Nucleari della Casaccia, Santa Maria di Galeria, Roma

Received: 1st September 1961*

INTRODUCTION

In 1955, BULL discovered that consumption by sheep of plants of *Heliotropium europaeum* L., *Crotalaria spectabilis* Roth, *Crotalaria retusa* L. and *Senecio jacobea* L., all containing pyrrolizidine alkaloids, leads to a progressive liver disease with cell necrosis and fibrosis. Laboratory experiments on rats, using the alkaloids extracted from the above plants, demonstrated a hepatotoxic and lethal effect for most of the alkaloids tested (BULL 1955; BULL, DICK and MC KENZIE 1958; BULL and DICK 1959, 1960; SCHOENTAL and HEAD 1955; SCHOENTAL and MAGEE 1957). SCHOENTAL and MAGEE also suggested the possibility that some of them may be carcinogenic.

Later CLARK (1959, 1960) tested 11 pyrrolizidine alkaloids for possible mutagenic properties and discovered their ability to produce sex-linked recessive lethals in adult males of *Drosophila melanogaster*.

In view of the interest of the above observations on the biological activity of the pyrrolizidine alkaloids, an investigation on the cytological effect of those substances in the *Allium* test was undertaken.

MATERIAL AND METHODS

For the present investigation, the following alkaloids were used: heliotrine, lasiocarpine, monocrotaline, jacobine, supinine and seneciphylline. Experimental material consisted of root-tips of onion bulbs. The experiments involved both treatments with alkaloids alone and combined treatments with alkaloids and cysteine. In the first type of treatments, the alkaloids were dissolved in a few drops of absolute alcohol and then in water at three standard concentrations: 3.2, 1.6 and 0.8×10^{-3} M/l. For seneciphylline, due to its low water solubility, saturated solutions and dilutions $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of them were used. On account of this difference in concentration, sene-

*This is Contribution no. 29 of the "Laboratorio per le Applicazioni in Agricoltura del Comitato Nazionale per l'Energia Nucleare", Centro Studi Nucleari della Casaccia, Santa Maria di Galeria, Rome, Italy.

ciphylline was not included in Table I. The pH value was always between 8 and 9, but we did not adjust it because preliminary observations did not show any appreciable difference, in both mitosis inhibition and chromosome breakage, between solutions at high pH and solutions adjusted to pH 7. The treatments lasted 24, 48, 72 hours and were followed by recovery periods of one to three days in tap water.

For combined treatments we used lasiocarpine and monocrotaline in only one concentration, namely 3.2×10^{-3} M/l. The solutions were prepared as in the previous experiments and quantities of cysteine hydrochloride were added to them to achieve concentrations of 6.2, 3.1 and 1.5 M/l. Since the pH value was low, we adjusted it to 6.0 by addition of sodium bicarbonate. The exposition period was 24 hours followed by a recovery period of 24 and 48 hours in tap water. For better accuracy of the experiment, we halved the onion bulbs, treating one half with the alkaloid alone and the other one with alkaloid plus cysteine. To obtain information on both the chromosome breaking and the mitosis inhibiting effect of the treatments, the following data were collected (scoring at anaphase): 1) percentage of abnormal anaphases; 2) number of chromatid and chromosome breaks (B' and B'' resp.) per cell; 3) percentage of cells in mitosis.

Every treatment was made on three bulbs, or three halved bulbs, and 4 root tips from each of them were fixed at any collection time. Mitotic index was calculated on a total of 18,000 cells per treatment (1,500 cells for each of the 12 root tips). Fixation took place in alcohol-acetic acid 3:1 and the slides were prepared as Feulgen squashes.

EXPERIMENTAL RESULTS

The results of the tests on the chromosome breaking effect of five alkaloids on the onion root are given in Table I. From the Table the different ability of the chemicals investigated to induce chromosome damage is seen. The most active substance appears to be lasiocarpine followed by heliotrine, monocrotaline, jacobine, supinine. This difference in activity between lasiocarpine and the remaining alkaloids is obvious from both the percentage of abnormal anaphases and the number of breaks per cell. Although none of the alkaloids studied possesses the ability to suppress mitosis from the meristems in continuous exposure treatments, clear differences in mitotic indexes in the various recovery experiments are observed. Here again, lasiocarpine manifests the highest mitosis inhibiting effect.

A survey of data in Table I shows that almost aberrations are of chromatid type; we failed to find chromosome rearrangements even after three to four days of recovery following three days of treatment with the alkaloid. Only with lasiocarpine, we observed isolated cases of chromosome bridges. The reunion index, *i.e.* the ratio of breaks which underwent reunion to the total number of breaks, shows reunion to be very high. It is, therefore, clear that, from a qualitative point of view, the cytological effect of pyrrolizidine alkaloids is of the same kind. To give a better picture of the chromosome breaking effect of

Alkaloids	Concentration $\times 10^{-3}\text{M/l}$	Period of treatment hrs	Recovery period hrs	No. anaphases analysed	Abnormal anaphases %	No. breaks per cell		Reunion index	Mitotic index
						B' (\pm S.E.)	B''		
None (Control)									
Heliotrine	3.2	24	24	2000	0.25	0.002	0.001	0	5.06
			48	315	24.12	0.38 ± 0.031	0.06	0.62	3.85
	1.6	24	24	359	24.23	0.26 ± 0.033	0.03	0.54	4.54
			48	554	7.04	0.095 ± 0.016	0.01	0.60	4.80
	0.8	24	24	670	6.71	0.10 ± 0.016	0.005	0.58	5.63
48			176	5.26	0.06 ± 0.033	0	0.40	4.60	
Lasiocarpine	3.2	24	24	177	0	0	0	0	5.07
			48	101	39.60	0.66 ± 0.059	0.09	0.78	1.63
	1.6	24	24	107	81.00	2.27 ± 0.15	0.13	0.87	2.84
			48	150	32.00	0.71 ± 0.096	0.02	0.65	3.10
	0.8	24	24	103	41.74	0.93 ± 0.13	0.05	0.72	2.82
48			71	49.20	1.05 ± 0.15	0.04	0.62	3.03	
Monocrotaline	3.2	24	24	103	72.00	1.72 ± 0.23	0.09	0.38	3.63
			48	407	13.26	0.20 ± 0.030	0.01	0.66	3.60
	1.6	24	24	467	15.84	0.24 ± 0.013	0.02	0.63	5.61
			48	297	16.83	0.26 ± 0.035	0.01	0.49	3.47
	0.8	24	24	486	16.87	0.22 ± 0.027	0.01	0.25	5.25
48			266	8.27	0.12 ± 0.036	0.01	0.58	5.03	
Jacobine	3.2	24	24	183	8.74	0.14 ± 0.039	0.005	0.59	5.33
			48	246	7.31	0.13 ± 0.031	0	0.82	2.78
	1.6	24	24	159	33.33	0.62 ± 0.077	0.02	0.78	4.69
			48	175	12.00	0.16 ± 0.035	0.01	0.45	3.62
	0.8	24	24	273	27.93	0.40 ± 0.046	0.01	0.43	4.88
48			305	3.60	0.04 ± 0.013	0	0.14	3.13	
Supinine	3.2	24	24	312	7.37	0.09 ± 0.002	0.009	0.54	5.67
			48	398	2.26	0.01 ± 0.007	0.007	0.20	4.37
	1.6	24	24	468	3.63	0.04 ± 0.012	0.004	0.40	6.95
			48	317	1.57	0.02 ± 0.011	0.003	0.25	5.01
	0.8	24	24	120	4.16	0.04 ± 0.018	0.008	0.33	4.89
48			121	0.82	0.01 ± 0.001	0	0	4.64	
			48	396	1.01	0.01 ± 0.005	0	0.66	5.27

the most active treatments, the various types of aberrations observed are gathered in Table II. In this Table, the ratio of fragments to bridges, calculated to supplement the values of the reunion index of Table I, varies from 1.35 for lasiocarpine to 4.5 for monocrotaline. Moreover, in all but one treatment, the lower the concentration, the greater is the quotient.

TABLE II.
Frequency of the various types of aberrations in "Allium cepa" roots induced by pyrrolizidine alkaloids. The ratio of fragments to bridges is also reported.

Alkaloids $\times 10^{-3}\text{M/l}$	Period of treatment hrs	Recovery period hrs	Chromosome bridges per cell	Chromatid bridges per cell	Chromosome fragments per cell	Chromatid fragments per cell	Fragments bridges
Heliotrine							
3.2	24	48	0	0.075	0.044	0.18	3.75
1.6	24	48	0	0.020	0.007	0.032	2.30
Lasiocarpine							
3.2	24	48	0.019	0.48	0.068	0.54	1.35
1.6	24	48	0.055	0.97	0.32	0.94	1.38
Monocrotaline							
3.2	24	48	0	0.10	0.025	0.15	2.03
1.6	24	48	0	0.039	0.020	0.17	4.50
Jacobine							
3.2	24	48	0.006	0.25	0.019	0.37	1.58
1.6	24	48	0	0.11	0.029	0.26	2.80

As to seneciophylline, the highest frequency of abnormal anaphases (5.2%) was obtained in the second day of recovery following a 24-hour treatment with the saturated solution of the alkaloid (ca. $0.7 \times 10^{-3}\text{M/l}$). With seneciophylline also, the aberrations were all of chromatid type and the reunion index was high.

In Tables III and IV the results of experiments on the cytological effect of lasiocarpine and monocrotaline ($3.2 \times 10^{-3}\text{M/l}$) alone and in combination with different doses of cysteine are reported; in all cases, a noticeable protective effect of cysteine is observed. If cysteine protection against lasiocarpine is measured in terms of aberrant anaphases per cent, it varies from ca. 87% in the highest concentration of cysteine to ca. 43% in the lowest one, whilst values of ca. 91.5 and 58% resp. are obtained when damage in terms of breaks per cell is considered. The favourable effect of cysteine is also evidenced by a 2 to 3-fold

TABLE III.

Cytological effects in *Allium cepa* root tips induced by lasiocarpine and cysteine hydrochloride alone and in combined treatments.
 Reunion index: ratio of breaks which underwent reunion to the total number of breaks. Mitotic index: percentage of cells in mitosis.

Lasiocarpine $\times 10^{-3}\text{M/l}$	Cysteine hydrochloride $\times 10^{-3}\text{M/l}$	Period of treatment hrs	Recovery period hrs	No. anaphases analyzed	Abnormal anaphases %	No. Breaks per cell		Reunion index	Mitotic index
						B' (\pm S.E.)	B''		
0	0 (Control)			2000	0.25	0.002	0.001	0	5.06
3.2	0	24	24	67	31.91	0.61 ± 0.06	0	0.82	0.79
3.2	6.2	24	24	273	6.21	0.09 ± 0.01	0.01	0.76	2.17
3.2	0	24	48	48	88.88	2.00 ± 0.21	0.05	0.61	1.09
3.2	6.2	24	48	226	11.06	0.17 ± 0.02	0.004	0.78	4.17
3.2	0	24	24	85	45.87	0.91 ± 0.09	0.02	0.75	1.93
3.2	3.1	24	24	316	9.17	0.13 ± 0.03	0.003	0.60	3.31
3.2	0	24	48	68	43.82	1.04 ± 0.12	0.01	0.75	1.54
3.2	3.1	24	48	301	11.96	0.20 ± 0.03	0.003	0.50	4.26
3.2	0	24	24	110	37.27	0.71 ± 0.08	0.03	0.60	1.02
3.2	1.6	24	24	250	13.60	0.19 ± 0.02	0.02	0.80	2.53
3.2	0	24	48	49	72.41	1.82 ± 0.20	0.07	0.59	1.30
3.2	1.6	24	48	201	41.29	0.78 ± 0.08	0.28	0.53	4.77
0	6.2	24	24	60	0	0	0		1.24
0	6.2	24	48	174	1.15	0.005	0.006	0	7.34
0	3.1	24	24	155	0	0	0		2.37
0	3.1	24	48	180	0.11	0.01	0	0	4.75
0	1.6	24	24	237	1.68	0.02	0	0	3.66
0	1.6	24	48	155	0	0	0		2.59

TABLE IV.

Cytological effects in "Allium cepa" root tips induced by monocrotaline and cysteine hydrochloride alone and in combined treatments. Reunion index: ratio of breaks which underwent reunion to the total number of breaks. Mitotic index: percentage of cells in mitosis.

Monocrotaline $\times 10^{-3}\text{M/l}$	Cysteine hydrochloride $\times 10^{-3}\text{M/l}$	Period of treatment hrs	Recovery period hrs	No. anaphases analysed	Abnormal anaphases %	No. Breaks per cell		Reunion index	Mitotic index
						B' (\pm S.E.)	B''		
0	0 (Control)			2000	0.25	0.002	0.001	0	5.06
3.2	0	24	24	347	10.09	0.14 ± 0.016	0	0.40	2.47
3.2	6.2	24	24	294	0.34	0.007	0	0	2.10
3.2	0	24	48	488	11.47	0.16 ± 0.018	0.014	0.74	4.72
3.2	6.2	24	48	344	2.32	0.03 ± 0.006	0.003	0.72	4.53
3.2	0	24	24	304	8.94	0.13 ± 0.016	0.006	0.58	4.32
3.2	3.1	24	24	375	1.33	0.008	0	0	4.11
3.2	0	24	48	326	19.00	0.29 ± 0.032	0.003	0.62	5.50
3.2	3.1	24	48	334	1.79	0.003	0	0	4.82
0	6.2	24	24	60	0	0	0	0	1.24
0	6.2	24	48	174	1.15	0.006	0.006	0	7.34
0	3.1	24	24	155	0	0	0	0	2.37
0	3.1	24	48	180	0.11	0.011	0.001	0	4.75

increase in the mitotic index in the combined treatment lasiocarpine plus cysteine. On the contrary, no alleviating effect on mitosis by cysteine is observed in the experiments with monocrotaline.

TABLE V.
Relative biological activity of pyrrolizidine alkaloids (lasiocarpine = 1)

Alkaloids	Mutagenic activity in <i>Drosophila</i> (CLARK 1960)	Chromosome breaking effect in <i>Allium</i>	
		I (+)	II (++)
Lasiocarpine	1	1	1
Heliotrine	0,90	0.21	0.12
Monocrotaline	1,60	0.25	0.14
Jacobine	0,08	0.29	0.19
Supinine	0,20	0.01	0.01

(+) Based on percentage of abnormal anaphases.
(++) Based on the number of B's per cell.

As to cysteine protection against chromosome breakage by monocrotaline, the protection values obtained do not seem to differ consistently from the ones observed in the experiments with lasiocarpine.

DISCUSSION

The present experiments enable us to compare the chromosome breaking ability of the chemicals investigated with their mutagenic activity in *Drosophila* (CLARK 1959, 1960). From table V it is seen that no parallel exists between mutagenicity and chromosome breaking effect. Thus, for example, monocrotaline is the strongest mutagenic agent in *Drosophila*, whilst lasiocarpine is the most active as to induction of chromosomal damage. The lack of parallelism between the two effects would be due to the fact that, according to HERSKOWITZ (1951), many lethal factors are formed independently of chromosome breakage. If chromosome breakage in relation to mitosis inhibition is considered, it is seen (cf. table I) that lasiocarpine, the most active substance, induces the strongest reduction in the mitotic index as compared with the control value. With the much less active substances monocrotaline, heliotrine, jacobine and supinine, the mitotic index is not so strongly affected as with lasiocarpine. If, however, the course of the chromosome breaking effect in relation to type of treatment

is taken into account for each of the chemicals, it is generally clear that, between a 24- and a 48-hour recovery period, an increased chromosomal damage in parallel with an improvement of the mitotic index takes place. This might be due either *a)* to the fact that a higher mitotic frequency makes expression of chromosomal aberrations easier or *b)* to a delay in mitosis of cells bearing chromosomal damage.

An interesting feature of chromosome breakage by pyrrolizidine alkaloids is the general occurrence of aberrations of chromatid type, even after 3 to 4 days of recovery of roots treated with the alkaloid; *i.e.* at a time when aberrations of chromosome type should be present. KIHLMAN (1951), dealing with the chromosome breaking effect of purine derivatives, suggested that some of them would not be able to penetrate the nuclear membrane for their molecular size or low solubility in fat solvents. As a consequence, these substances could act on the chromosomes only during mitosis, when the nuclear membrane disappears. If KIHLMAN's opinion is accepted, it might be reasoned that pyrrolizidine alkaloids could only effect chromosome breakage during mitosis; a condition evidently leading to aberrations of chromatid type only. Apart from the fact that the chemical properties of the pyrrolizidine alkaloids may not be in line with Kihlman's interpretation, it should be admitted that these compounds are able to persist in the treated roots for many days to be active on the cells while entering mitosis. But, at present, no evidence is available on this point. Another possibility is that breaks induced by our alkaloids in the resting stage may remain open and fusions occur only when chromosomes are effectively split, leading to chromatid aberrations. As to the high frequency of chromatid bridges induced by the pyrrolizidine alkaloids, REVELL's (1954) contact hypothesis is perhaps the best explanation of the phenomenon. We should think that breaks induced by pyrrolizidine alkaloids undergo fusion very easily: *a)* either restitution, when there is no contact between chromatids of the same chromosome or of different chromosomes, *b)* or exchange when contact is present. But REVELL's interpretation does not seem to apply to the cases of bridges without fragments we sometimes found; although it may be admitted that, in those cases, the accompanying fragments were too small to be microscopically detectable. (*cf.* D'AMATO 1949).

An interesting finding of the present investigation is that cysteine is able to reduce cytological damage to the *Allium* roots induced by pyrrolizidine alkaloids. The protective effect of cysteine as observed in our experiments is much higher than any chemical protection against radiation induced chromosome aberrations obtained so far. Namely, previous investigations demonstrated a maximum reduction in both fragment and bridge frequency of 50-70 per cent (MIKAELSEN 1952-1955; FORSSBERG and NYBOM 1953; RILEY 1955, 1957). On the contrary, we reached a protection value of 80-90 per cent both in the percentage of abnormal anaphases and in the number of B's per cell. In the combined treatment alkaloids plus cysteine, the reunion index was not changed appreciably, as com-

pared with the treatments with alkaloid alone. It seems, therefore, very probable that cysteine protection is mainly or totally due to a general reduction in number of the mutagen-induced actual breaks. The mechanism of cysteine protection against chromosomal damage by pyrrolizidine alkaloids is not known. By analogy with the data from radiobiological work (*cfr.* ELDJARN 1961), it might be assumed that cysteine protection against our alkaloids is operating by a lowering of the intracellular oxygen tension. This would imply an oxygen dependence of the cytological effect of the pyrrolizidine alkaloids, such as is known for other chemical mutagens, *i.e.* 8-ethoxycaffeine (EOC) and KCN (KIHLMAN 1955, 1956; LILLY and THODAY 1956). An investigation on the influence of oxygen on the chromosome breaking effect of lasiocarpine and monocrotaline will be carried out in the near future. As pointed out by KIHLMAN (1955), the oxygen effect in the case of EOC is operating by the way of the respiratory chain. In this connection, it is of interest to recall that CHRISTIE (1958), working on acute liver poisoning by heliotrine in rats, observed the sudden disorganization of the Krebs cycle and the loss of activity of DPN dependent respiratory enzymes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Dr. C. C. J. CULVENOR, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Industrial Chemistry, Melbourne, Australia, for providing the alkaloids used in this investigation. She is also very much indebted to Professor F. D'AMATO, University of Pisa, for help and criticism throughout the investigation and to Professor G. T. SCARASCIA, Comitato Nazionale per l'Energia Nucleare, Rome, for the many working facilities offered.

REFERENCES

- BULL L. B., 1955. — *The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids.* Aust. Vet. J., **31**: 33-40.
- BULL L. B. and DICK A. T., 1959. — *The chronic pathological effects on the liver of the rat of the pyrrolizidine alkaloids heliotrine, lasiocarpine and their N-oxides.* J. Path. Bact., **78**, 2: 483-502.
- , 1960. — *The function of total dose in the production of chronic lethal liver disease in rats by periodic infections of the pyrrolizidine alkaloid heliotrine.* Aust. Jour. Biol. Med. Sci., **38**: 515-523.
- BULL L. B., DICK A. T. and MC KENZIE J. S., 1958. — *The acute toxic effects of heliotrine and lasiocarpine and their N-oxides on the rat.* J. Path. Bact., **75**: 17-25.
- CLARK A. M., 1959. — *Mutagenic activity of the alkaloid heliotrine in Drosophila.* Nature (Lond.), **183**: 731-732.
- , 1960. — *The mutagenic activity of some pyrrolizidine alkaloids in Drosophila.* Zeitschr. für Vererbungslehre, **91**: 74-80.
- D'AMATO F., 1949. — Discussion in the « Symposium on chemical mutagens ». Pubbl. Staz. Zool. Napoli, **22** (Suppl.): 182.
- ELDJARN L., 1961. — *Chemical protection against ionizing radiation. Radiochemistry or cellular physiology?* Symposium on Radiation effects and Milieu, Montreux, 1961.

- FORSSBERG A. and NYBOM N., 1953. — *Combined effects of cystein and irradiation on growth and cytology of Allium cepa roots*. Physiol. Plantarum, **6**: 78-95.
- HERSKOWITZ J. H., 1951. — *The genetic basis of X-ray induced recessive lethal mutations*. Genetics, **36**: 356-363.
- KIHLMAN B., 1951. — *The permeability of the nuclear envelope and the mode of action of purine derivatives on chromosomes*. Symbolae Botan. Uppsal., **11**, 2, 39 pages.
- , 1955. — *Studies on the effect of oxygen on chromosome breakage induced by 8-ethoxy caffeine*. Exptl. Cell Res., **3**: 404-407.
- , 1955. — *Oxygen and the production of chromosome aberrations by chemicals and X-rays*. Hereditas, **41**: 384-404.
- , 1956. — *Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals*. Journ. Biophys. and Biochem. Cytol., **2**: 543-555.
- LILLY L. J. and THODAY M. J., 1956. — *Effects of cyanide on the roots of Vicia faba*. Nature (Lond.), **177**: 338-339.
- MIKAELSEN K., 1952. — *The protective effect of glutathione against radiation induced chromosome aberrations*. Science, **116**: 172-174.
- , 1954. — *Protective properties of cysteine, sodium hyposulphite and sodium cyanide against radiation induced chromosome aberrations*. Proc. Nat. Acad. Sci., **40**: 171-178.
- , 1955. — *The protective properties of thiourea against radiation-induced chromosome aberrations*. Exptl. Cell Res., **8**: 400-403.
- REVELL S. H., 1954. — *A new hypothesis for "chromatid" changes*. Radiobiology Symposium, Liège, 243-253.
- RILEY H. P., 1955. — *The protective effect of various chemical compounds against damage to the chromosomes*. Amer. J. Bot., **42**: 765-769.
- , 1957. — *Chemical protection against X-ray damage to chromosomes*. Genetics, **42**: 593-600.
- SCHOENTAL R. and HEAD M. A., 1955. — (Cited by CLARK, 1960).
- SCHOENTAL R. and MAGEE P. M., 1957. — (Cited by CLARK, 1960).

SUMMARY

The author has studied the cytological effect, in onion root tips, of 6 pyrrolizidine alkaloids already known to be hepatotoxic in mammals and mutagenic in *Drosophila*.

A comparative analysis of the effect of treatments with solutions of identical concentrations ($3.2, 1.6$ and $0.8 \times 10^{-3}M/l$) and for identical durations (24-hour treatment followed by one, two and several days of recovery into water) has shown that:

1. - all the alkaloids studied are able to induce chromosomal damage, the most active being lasiocarpine, heliotrine and jacobine;

2. - no qualitative difference in action exists between the 6 alkaloids: the aberrations observed are almost exclusively of chromatid type, even in recovery experiments of long duration, in which aberrations due to chromosome breakage in the pre-split phase should occur;

3. - a characteristics common to the alkaloids studied is the high relative frequency of chromatid bridges to fragments. Such a high reunion ability of broken ends has not been observed so far in *Allium*, neither with radiations nor with chemical mutagens.

Investigations on possible protective effects have shown that cysteine, when used in simultaneous treatments with lasiocarpine and monocrotaline, can reduce as much as 85% the chromosomal damage induced by the two alkaloids.

The data obtained seem to offer indications of a lack of correlation between toxic effect and chromosome breaking effect in pyrrolizidine alkaloids.

RIASSUNTO

È stata studiata l'attività citologica, su apici radicali di *Allium cepa*, di 6 alcaloidi pirrolizidinici già noti come epatotossici nei mammiferi e mutageni in *Drosophila*.

Una analisi comparata della attività di trattamenti con soluzioni ad identiche concentrazioni ($3.2; 1.6; 0.8 \times 10^{-3} \text{M/l}$) e per identiche durate (24 ore di trattamento seguite da uno, due o più giorni di ripresa in acqua) hanno mostrato che:

1. - tutti gli alcaloidi studiati inducono danneggiamento cromosomico, di gran lunga i più attivi dimostrandosi la lasiocarpina, l'eliotrina e la jacobina;

2. - non esiste differenza qualitativa nell'azione dei 6 alcaloidi: le aberrazioni riscontrate sono quasi esclusivamente cromatiniche anche per riprese di lunga durata nelle quali dovrebbero apparire aberrazioni dovute a rottura pre-split;

3. - una caratteristica comune a queste sostanze è l'elevata frequenza relativa dei ponti cromatidici rispetto ai frammenti. Una così notevole capacità di riunione di estremità rotte non è mai stata riscontrata finora in *Allium*, nè con radiazioni, nè con mutageni chimici.

Ricerche su eventuali effetti protettori hanno mostrato che la cisteina, se usata in trattamenti simultanei con la lasiocarpina e la monocrotalina, può ridurre di circa l'85% il danneggiamento cromosomico da essi indotto.

I dati raccolti in questi esperimenti sembrano dare indicazioni circa l'assenza di correlazione fra effetto tossico ed attività mutagenica negli alcaloidi pirrolizidinici.



CYTOLOGICAL INVESTIGATIONS IN *MICROSORIUM PUNCTATUM* (L.) COPEL. AND *M. MEMBRANACEUM* (DON.) CHING

SUNANDA PAL and NIRANJAN PAL

Botany Department, Muralidhar Girls College, Calcutta 29, India, and Biology Department,
Maulana Azad College, Calcutta 13, India

Received: 1st July 1961*

In recent years, cytological observations, particularly the chromosome numbers are being utilised for proper identity and determination on affinity of fern species and genera. Such investigations on the members of Polypodiaceae (sensu stricto) are, however, comparatively meagre. Mention of the works of MANTON (1947, 1950, 1951, 1954, 1959), MANTON and SLEDGE (1954), BROWNLIE (1954, 1958), FABBRI (1957), NAYAR (1958) and VERMA and LOYAL (1960) may be made. Recently, the present authors have made two contributions on the cytology of some species of Polypodiaceae (PAL 1961; PAL and PAL 1961).

MANTON (1954, 1959) and MANTON and SLEDGE (1954) have determined the chromosome number of a few species of *Microsorium* from Malaya, W. Africa and Ceylon as $n = 36$. BROWNLIE (1954, 1958) on the other hand, found $n = 37$ in two species from New Zealand. VERMA and LOYAL (1960) reported $n = 36$ for *M. membranaceum* occurring in Western Himalaya.

The chromosome number in ferns, in general, is high, rendering karyotype analysis difficult. But the importance of the study on somatic chromosomes cannot be ignored. It is unfortunate that such observations in ferns are rare. Detailed investigations on the behaviour of the meiotic chromosomes in ferns are also equally infrequent. In course of an investigation on the morphology and life-history of several genera of Polypodiaceae, an attempt has been made to find out the salient features of the somatic chromosomes, as well as meiotic behaviour in these species and the present account deals with the findings made on two species of *Microsorium*.

MATERIALS AND METHODS

The present investigation is made on two species of *Microsorium*, viz. *M. punctatum* (L.) Copel. and *M. membranaceum* (Don.) Ching. Materials of the former species were collected from the Science College Campus of Calcutta University and those of the latter from the nursery of Sibpore Botanical Garden. The fixation was

*This work was carried out at the Botany Laboratory, Calcutta University, India.

made chiefly during the rainy season when profuse vegetative growth occurs and sporangia are formed.

Fixatives like acetic-alcohol in different proportions (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) and Carnoy's fluid (3:1:1) were tried for studies on meiotic division by smear method of which 1:3 acetic-alcohol gave best results. Young sporangia were dissected and smeared in aceto-carmin, propino-carmin and aceto-orcin of which the last stain gave best results. For paraffin method, chromo-acetic-formalin and 2-BD were also used with success, but in this case also, 1:3 acetic-alcohol was found to be most effective for *M. membranaceum*, whereas Carnoy's fluid was found suitable for the other species. Sections were cut 18 μ thick and stained with Newton's crystal violet-iodine. For root-tip squashes, several chemicals (which are known to be effective in bringing out and clarifying the morphology of somatic chromosomes in angiosperms) were examined as reagents for pretreatment. Of these, saturated aqueous solution of paradichlorobenzene (with a drop of 10% formalin in 10 c.c. of the solution) gave very satisfactory results. The following schedule was followed:

1. Pretreatment (as mentioned above) for 1 hour at about 15° C.
2. Fixation in 1:3 acetic-alcohol for 1 hour.
3. Hydrolysis and staining in a mixture of 9 parts of 2% orcin in 45% acetic acid and 1 part N/HCl.
4. Squashing in 1% orcin in 45% acetic acid.

Microtomic method for the study of somatic chromosomes from root-tips were found unsatisfactory as the high number of large-sized chromosomes remain non-clarified and overlapping each other. The peak period for somatic and meiotic divisions lies between 9 A.M. to 11 A.M.

OBSERVATIONS

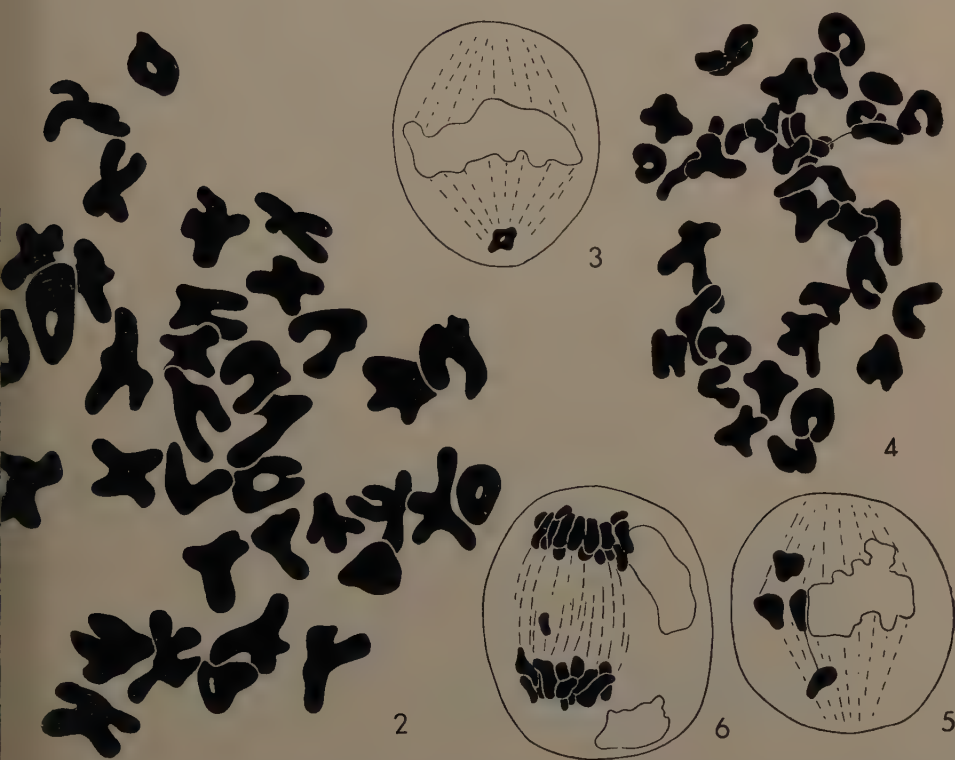
Detailed analysis of the karyotypes is not possible in these plants due to the presence of high number of chromosomes as also to the fact that many of these chromosomes exhibit only a little difference between them as regards their length and/or position of the centromere. The somatic chromosomes in this investigation have been graded into small, medium and large according to their length (short - upto 3 μ , medium - 3-5 μ , large - above 5 μ). The position of the centromere is considered to be subterminal when short arm/long arm ratio is 1:3 or less and submedian when it lies between 1:2 and 1:3. The size of the meiotic chromosomes in any of the species vary considerably between smeared and microtome preparations. In description of chromosomes the terminology of BATTAGLIA (1955) is followed.

Microsorium punctatum.

The somatic number of chromosomes is 72 only (Figs. 1 and 8). Size difference of the chromosomes is not marked and ranges from 2.9 μ to 6.6 μ . All chromosomes except a small medium-sized pair (which possesses nearly median



Fig. 1. — *Microsorium punctatum*. Somatic chromosomes in pretreated root-tip cell. $\times 2260$.



Figs. 2-3. — *Microsorium punctatum*. $\times 1700$. Fig. 2. - Diakinesis in the spore mother cell (from smeared preparation). Fig. 3. - Precocious movement of a non-disjunct bivalent. Figs. 4-6. — *Microsorium membranaceum*. $\times 1700$. Fig. 4. - Diakinesis (from smeared preparation). Fig. 5. - Precocious movement of chromosomes in anaphase I. Fig. 6. - Tetrad formation.

centromere) show the presence of subterminal centromeres. The short arm in many chromosomes are exceedingly small. Considering their length, the chromosomes may be grouped as follows:

- a) Eleven pairs of long chromosomes.
- b) Twenty-four pairs of medium-sized chromosomes.
- c) Only one pair of short chromosome.



Fig. 7. — *Microsorium membranaceum*. Somatic chromosomes in pretreated root-tip cells $\times 2260$.

At diakinesis, 36 pairs of chromosomes show the usual appearance (Figs. 8 and 9). Size difference of the bivalents is not very pronounced. First division seems to be normal except in some cases where precocious movement of disjuncted or sometimes nondisjuncted chromosomes (Fig. 3) could be encountered. Dya cells are well organized. Second division is also normal. Some spore-tetrads may be arranged isobilaterally.

Microsorium membranaceum.

72 chromosomes were also found in the somatic complement of this species (Figs. 7 and 10). Variation in size (2.9μ to 6.0μ) of the chromosomes is slightly less than in the other species. The somatic chromosomes in this plant are, in general, similar to those found in *Microsorium punctatum*, except that in this species, there are two pairs with submedian centromere. The chromosomes fall under the following groups:

- a) Four pairs of long chromosomes.

b) Thirty-one pairs of medium-sized chromosomes.

c) Only one pair of short chromosome as was also found in the other species.

At diakinesis 36 bivalents show the usual forms (Fig. 4). In metaphase I, early disjunction of one or a few of the bivalents could be noticed (Fig. 5). Movement of some non-separated bivalents towards the poles were also observed in a few cases. Dyad formation occurs normally and the second division also

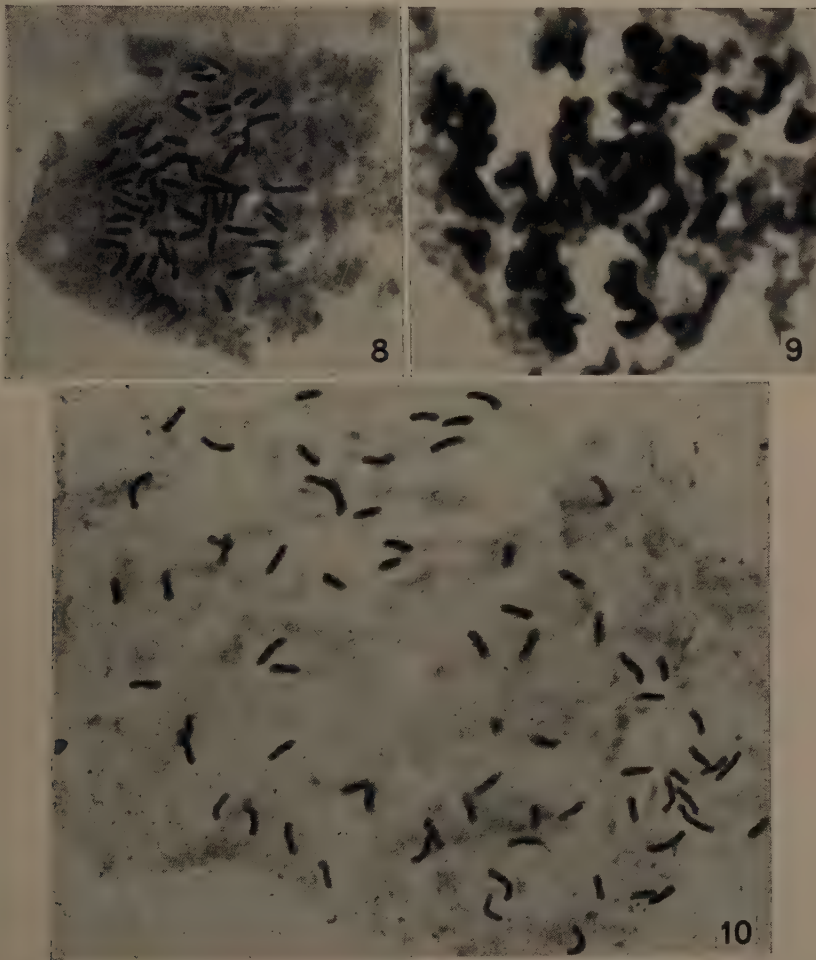


Fig. 8. — Somatic chromosomes from a root-tip cell in *Microsorium punctatum*. $\times 1130$.

Fig. 9. — Diakinesis in the spore mother cell of *Microsorium punctatum*. $\times 1130$ (for explanatory diagram see Fig. 2).

Fig. 10. — Somatic chromosomes in a root-tip cell of *Microsorium membranaceum*. $\times 1130$.

seems to be regular except in a few cases of late disjunction of one or a few bivalents (Fig. 6). Some of the spore-tetrads were found isobilateral in arrangement.

DISCUSSION

The behaviour of the meiotic chromosomes in the two species of *Microsorium* investigated is more or less regular indicating homogeny in their genetic constitution. The somatic chromosomes too, in general, are alike in them except that *M. punctatum* has more pairs of long chromosomes and *M. membranaceum* has two pairs of chromosomes with submedian centromere in contrast to the other species where only one such pair with nearly median centromeres occurs.

That nearly all the somatic chromosomes in *Microsorium* have subterminal centromeres seems to be a characteristic feature in polypodiaceous ferns. Similar observations have also been made in *Colysis pedunculata* (NAYAR 1958) and in some other genera (PAL, *unpublished*; PAL and PAL 1961). The fact that in any of these species the length of somatic chromosomes varies within a short range (the ratio being 1 : 2.1-2.3) is no less noteworthy.

The genus *Microsorium* is characterised by the chromosome number $n = 36$ (MANTON 1954, 1959; MANTON and SLEDGE 1954; VERMA and LOYAL 1960 and PAL 1961) except those ($n = 37$) reported by BROWNLIE (1954, 1958) on two New Zealand species. The species showing $n = 36$ represent the flora of Malaya, India, W. Africa and Ceylon. This diversity in chromosome numbers in the New Zealand members of *Microsorium* seems to be striking and further observations on more species of the genus from different geographical regions are required to reach any conclusion.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their sincere gratitude to Dr. I. BANERJI for his kind interest in this investigation.

REFERENCES

- BATTAGLIA E., 1955. — *Chromosome morphology and terminology*. Caryologia, **8**: 179-187.
 BROWNLIE G., 1954. — *Introductory note on cytotaxonomic studies of New Zealand ferns*. Trans. Roy. Soc. N. Z., **82**: 665-666.
 —, 1958. — *Chromosome numbers in New Zealand ferns*. Trans. Roy. Soc. N. Z., **85**, 213-216.
 FABBRI F., 1957. — *Sondaggi citogenetici nelle Polypodiaceae (sensu stricto)*. Caryologia, **10**: 402-407.
 MANTON I., 1947. — *Polyploidy in Polypodium vulgare*. Nature, **159**: 136.
 —, 1950. — *Problems in the cytology and evolution in the Pteridophyta*. Cambridge Univ. Press, London.

- MANTON I., 1951. — *Cytology of Polypodium in America*. Nature, **167**: 37.
- , 1954. — *Cytological notes on one hundred species of Malayan ferns*. Appendix to HOLTUM's "Flora of Malaya, Vol. II: Ferns". Govt. Press, Singapore.
- , 1959. — *Cytological information on the ferns of West Tropical Africa*. In A. H. G. ALSTON's "Ferns and Fern-allies of West Tropical Africa". London.
- MANTON I. and SLEDGE W. A., 1954. — *Observations on the cytology and taxonomy of the Pteridophyte flora of Ceylon*. Phil. Trans., **238B**: 127-185.
- NAYAR B. K., 1958. — *Studies in Polypodiaceae - V. Cytology of Colysis pedunculata*. Sci. and Cult., **24**: 181-182.
- PAL S., 1961. — *Chromosome numbers in some genera of Polypodiaceae*. Sci. and Cult. (in press).
- PAL S. and PAL N., 1961. — *Studies on the cytology of two species of Phymatodes*. Cytologia (in press).
- VERMA S. C. and LOYAL D. S., 1960. — *Chromosome counts in some ferns from Nainital*. Curr. Sci., **29**: 69-70.

SUMMARY

Observations are made on the meiotic behaviour and morphology of the somatic chromosomes in *Microsorium punctatum* (L.) Copel. and *M. membranaceum* (Don.) Ching. Both species show $n = 36$ and $2n = 72$.

Meiosis is more or less regular. The somatic chromosomes have close range of variation in length ($2.9-6.6 \mu$ in *M. punctatum* and $2.9-6.0 \mu$ in *M. membranaceum*) and most chromosomes have subterminal centromeres. In *M. punctatum*, there is only one chromosome with nearly median centromere whereas the other species has two pairs with submedian centromeres.

RIASSUNTO

Viene studiato il comportamento alla meiosi e la morfologia dei cromosomi somatici di *Microsorium punctatum* (L.) Copel. e di *M. membranaceum* (Don.) Ching. Ambedue le specie presentano $n = 36$ e $2n = 72$.

La meiosi è più o meno regolare. I cromosomi somatici hanno una gamma di variazione in lunghezza simile ($2,9-6,6 \mu$ in *M. punctatum* e $2,9-6,0 \mu$ in *M. membranaceum*) e la maggior parte di essi presentano centromeri subterminali. In *M. punctatum* vi è solo un cromosoma con il centromero quasi mediano mentre *M. membranaceum* ne ha due paia con centromeri submediani.



CONSIDERAZIONI SUL DETERMINISMO DEI CICLI CROMOSOMICI IN IBRIDI DI PLANARIE

GIUSEPPINA BENAZZI LENTATI

Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata dell'Università, Pisa

In Redazione: il 6 Luglio 1961 *

Le ricerche compiute sui Tricladi d'acqua dolce, *Dugesia benazzii* e *D. lugubris*, hanno dimostrato che le due specie sono rappresentate da vari biotipi cariologici. Interessa per questa nota ricordare i seguenti:

D. benazzii - 1°) Biotipo diploide ($2n = 16$, $n = 8$) sinaptico nelle due linee germinali ed anfimittico.

2°) Biotipo tetraploide nelle linee somatica e germinale femminile, la quale è asinaptica (32 univalenti negli ovociti, che compiono una sola divisione equazionale di maturazione); la linea maschile può essere tetraploide, subtetraploide o diploide (per uno sporadico e variabile processo di eliminazione) con formazione di spermi diploidi, subdiploidi e aploidi, poichè nella linea maschile vi è normale meiosi.

3°) Biotipo triploide nella linea somatica, esaploide (per un processo di duplicazione cromosomica) in quella femminile, la quale è sinaptica e meiotica (24 bivalenti negli ovociti); diploide in quella maschile (essendovi costante eliminazione di un assetto aploide) con spermi aploidi, poichè nella linea maschile vi è sempre normale meiosi. I due biotipi poliploidi hanno sviluppo pseudogamico.

D. lugubris - 1°) Biotipo diploide ($2n = 8$, $n = 4$) sinaptico nelle due linee germinali ed anfimittico.

2°) Biotipo triploide nella linea somatica, con duplicazione in quella femminile ed eliminazione in quella maschile, come il corrispondente biotipo di *Dugesia benazzii*; anche lo sviluppo è pseudogamico⁽¹⁾.

Nell'ambito delle due specie è possibile ottenere la fecondazione di uova del biotipo diploide anfimittico da parte di spermi dei biotipi poliploidi pseudogamici; infatti la pseudogamia non si manifesta quando si usi come femmina il biotipo diploide, poichè le modalità dello sviluppo sono controllate dall'uovo, secondo le nostre precedenti ricerche. Abbiamo pertanto ottenuto molti ibridi,

* Lavoro eseguito con la sovvenzione del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(1) Per una illustrazione completa di questi reperti si vedano i nostri lavori precedenti (BENAZZI 1950, BENAZZI e BENAZZI LENTATI 1950; BENAZZI LENTATI e NARDI 1950; BENAZZI LENTATI 1952, 1956; BENAZZI 1957, 1960).

nati da madre diploide delle due specie e caratterizzati da cicli cromosomici diversi, come già illustrato in altri lavori (BENAZZI e BENAZZI LENTATI 1956; BENAZZI LENTATI, POCHINI e SALINI 1956).

Desidero qui soffermarmi su alcune caratteristiche dei cicli cromosomici presentati da alcuni nati di prima generazione e di generazioni successive da incrocio e reinrocio.

Tratterò separatamente delle due specie.

Dugesia benazzii.

Mi riferisco ad un gruppo di individui nati da incrocio fra biotipo diploide e biotipo tetraploide; il loro corredo somatico risultò triploide, da cui si dedusse che avevano ricevuto un assetto dalla madre e due dal padre. Il loro ciclo cromosomico è caratterizzato da *duplicazione nella linea femminile, che è sinaptica e meiotica, e da eliminazione di un assetto aploide in quella maschile* (BENAZZI LENTATI e PUCCINELLI, 1959) (Tab. I, a). Tali caratteristiche pertanto non corri-

TABELLA I

a) $\begin{array}{c} P \quad (2n) \text{ ♀} \times (4n) \\ \hline F_1 \quad 3n6n2n \end{array}$	c) $\begin{array}{c} R_1 \quad (2n4n2n) \text{ ♀} \times (2n) \\ \hline R_2 \quad 3n6n2n \end{array}$
b) $\begin{array}{c} (2n) \text{ ♀} \times F_1 \quad (3n6n2n) \\ \hline R_1 \quad 2n4n2n \end{array}$	e) $\begin{array}{c} R_1 \times F_1 \\ \hline 3n6n2n \end{array}$
d) $\begin{array}{c} R_1 \times R_1 \\ \hline 3n6n2n \end{array}$	

Tra parentesi sono indicati i gradi di ploidia dei vari corredi: somatico, germinale femminile e germinale maschile; nel caso del biotipo diploide è indicato il corredo $2n$, che è proprio a tutte le linee; nel caso del biotipo tetraploide solo il corredo $4n$, poichè in questo incrocio interessa unicamente la linea maschile tetraploide (con spermidi diploidi). La R_1 contrassegnata con $2n4n2n$ mostra il solo corredo tetraploide degli ovociti, che sono gli unici che interessano l'incrocio in questione.

spondono in nulla a quelle del biotipo paterno tetraploide, mentre sono le stesse del biotipo naturale triplo-esaploide. Infatti nel biotipo paterno il soma e la linea femminile sono tetraploidi e pertanto *la linea femminile non duplica e gli ovociti, asinaptici, hanno una sola divisione di tipo equazionale; la linea maschile invece presenta eliminazione di cromosomi, ma sporadica e variabile*, per

cui gli spermi hanno corredo da diploide ad aploide. La F_1 (che pure ha ricevuto due assetti dal padre) non ha queste caratteristiche; evidentemente la realizzazione del ciclo cromosomico è influenzata da un complesso di condizioni e forse in primo luogo dallo stato di sinapsi dell'ovocita e dal grado di ploidia. Gli ovociti di tale F_1 inoltre, pur essendo pseudogamici, seguono meccanismi differenti da quelli degli ovociti del biotipo paterno; in questi ultimi lo spermio presenta posizione variabile rispetto al fuso e viene espulso o col polocita o con una gemma citoplasmatica (anche dopo la formazione del pronucleo femminile), mentre negli F_1 la posizione dello spermio rispetto al fuso è costante e l'emissione avviene sempre mediante il 1° polocita.

Altre considerazioni si possono fare studiando il ciclo cromosomico delle generazioni successive. Reinocrociando la F_1 funzionante da maschio (poichè l'incrocio reciproco è senza significato essendo la F_1 pseudogamica) col biotipo diploide ho ottenuto 12 nati⁽²⁾ così contraddistinti: 4 diploidi nelle linee somatica e germinale e 8 diploidi nelle linee somatica e maschile, mentre nella femminile si possono avere ovociti diploidi ed ovociti tetraploidi, nello stesso individuo⁽³⁾ (Tab. I, b). Tutti questi ovociti sono anfimittici; la fecondazione di quelli tetraploidi ad opera di spermi aploidi provenienti o dal biotipo diploide o dagli stessi nati R_1 o dalla F_1 , dà sempre uno zigote triploide, nel quale si ripete lo stesso ciclo della F_1 con duplicazione ed eliminazione (Tab. I, c, d, e). Si tratta di 14 nati ed è presumibile, tenendo presente la loro diversa origine, che non abbiano eguale genotipo, né fra loro, né rispetto alla F_1 . Il numero delle deposizioni di tali ultimi nati è stato scarso e non ho potuto approfondirne lo studio: ho tuttavia notato una differenza rispetto alla F_1 . In questa ultima, come risulta dal lavoro testè citato (BENAZZI LENTATI e PUCCINELLI 1959), quasi tutti gli ovociti presenti nei bozzoli sono esaploidi, mentre nei germigeni residuano degli ovociti provenienti da ovogoni il cui corredo cromosomico non ha subito duplicazione, restando quindi triploide: in media 1/3 di ovociti triploidi in ogni germigeno. Nei discendenti di tale F_1 , ora menzionati, il numero degli ovociti triploidi dei bozzoli è assai elevato e questo può essere un sintomo della loro maggior frequenza; non ho voluto compiere l'esame dei germigeni, per non privarmi dello studio di una intera stagione riproduttiva e, considerato lo scarso numero di ovociti deposti, non ho creduto opportuno neppure un esame statistico dei vari tipi di ovociti riferiti ai singoli individui⁽⁴⁾. Dal complesso risulta quindi che, qualunque sia il genotipo, non tutti gli ovociti si presentano con corredo duplicato e che

(2) Ho allestito tre coppie, ma una sola ha dato discendenti.

(3) La formazione di elementi germinali a corredo duplicato è da lungo tempo oggetto di nostre ricerche; l'ho già osservata in biotipi puri diploidi, nei quali però gli elementi duplicati degenerano (BENAZZI LENTATI 1952). Essa si fissa invece nei figli di padre poliploide, ma con oscillazioni intraindividuali, poichè in molti ibridi si hanno contemporaneamente goni duplicati e non duplicati, e quest'ultimi possono anche dare gameti maturi funzionanti, quando non vi sia corredo cromosomico perissoploide.

(4) Tale studio è stato iniziato per *D. lugubris* ove si verificano gli stessi fatti e che ha il vantaggio di deporre con molta abbondanza.

forse a seconda dei genotipi può variare il rapporto fra ovociti duplicati e non duplicati. Se pensiamo che la duplicazione è dovuta ad assenza di citodieresi (BENAZZI LENTATI 1952) si può forse spiegare tale variabilità ammettendo una interazione fra genotipo e condizioni fisiologiche del citoplasma.

Risultati consimili e ancor più significativi, per quello che si riferisce alla realizzazione dei cicli cromosomici, ho ottenuto in *D. lugubris*.

Dugesia lugubris.

L'incrocio fra individuo del biotipo diploide (sempre funzionante da femmina) ed individuo del biotipo triplo-esaploide (i cui spermatozoi sono però sempre aploidi) dà una F_1 diploide nelle linee somatica e maschile e diploide o tetraploide in quella femminile (Tab. II, a). Gli ovociti si possono sviluppare per

TABELLA II°

a) P $\frac{(2n) \text{ ♀} \times (3n6n2n)}{2n4n2n}$	
F_1	
b) $\frac{F_1 \times F_1}{3n6n2n}$	b') $\frac{(2n) \text{ ♀} \times F_1}{2n4n2n}$
F_2	R_1
c) $\frac{F_1 \text{ ♀} \times (2n)}{3n6n2n}$	c') $\frac{R_1 \text{ ♀} \times (2n)}{3n6n2n}$
R_1	R_2
d) $\frac{R_2 \text{ ♀} \times (2n)}{4n8n2n^{**}}$	
R_3	

* Valgano le avvertenze di cui alla Tab. I.

** Lo stesso corredo tetraottoploide si ha partendo dalla F_2 ($3n6n2n$) o dalla R_1 ($3n6n2n$) dei casi b e c.

anfimissi o per pseudogamia⁽⁵⁾; non prendendo in considerazione gli ovociti diploidi e quelli tetraploidi pseudogamici e riferendomi solo a quelli anfimittici, osservo che dopo fecondazione da parte di spermatozoi provenienti o dalla stessa F_1 ⁽⁶⁾ o dal biotipo materno (o, naturalmente, dal biotipo paterno) danno sempre

(5) Su tale peculiare comportamento non mi soffermo, essendo oggetto di altre ricerche in corso (si veda anche BENAZZI e BENAZZI LENTATI 1959).

(6) I primi nati triploidi furono rinvenuti anni fa nella coltura comune dei discendenti della F_1 dell'incrocio iniziale: avevamo pensato che il loro sviluppo per anfimissi ed il loro ciclo triplo-esaploide fossero legati ad un particolare genotipo; solo successivamente mi sono accorta che tutti i nati triploidi hanno simile ciclo, indipendentemente dal genotipo dei due genitori.

nati triploidi nella linea somatica (numero complessivo ottenuto 45) con duplicazione in tutti gli ovociti trovati nei bozzoli e con eliminazione nella linea maschile, che si mantiene sempre diploide, con spermi aploidi (Tab. II, b, c).

In *D. lugubris*, per la scarsa colorabilità dei cromosomi degli ovociti contenuti nei germigeni, è poco proficuo lo studio per schiacciamento e perciò non si può stabilire se nei germigeni vi siano ovociti non duplicati; comunque tutti quelli presenti nei bozzoli sono duplicati, come nel biotipo naturale triplo-esaploide; e questo in tutti i 45 ibridi esaminati. Proseguendo poi le ricerche ho visto che dalla fecondazione di uova del biotipo diploide ad opera di spermi della F_1 si ottengono nati che al momento della maturità sessuale danno essi pure ovociti diploidi e tetraploidi (Tab. II, b').

Gli ovociti tetraploidi anfimittici fecondati da spermio del biotipo diploide danno nati triploidi (numero complessivo 30) in cui si ripete il solito ciclo (Tab. II, c'). A lor volta questi ovociti esaploidi, se anfimittici, fecondati da spermi di individuo diploide, danno nati tetraploidi (per unione del corredo aploide dello spermio con quello triploide dell'uovo) che alla maturità sessuale presentano ovociti ottoploidi e spermatociti sempre diploidi (Tab. II, d'). La regolazione del ciclo con duplicazione ed eliminazione avviene quindi, con sicurezza, fino alla R_4 anche se un solo spermio del biotipo naturale triplo-esaploide è stato introdotto nella serie degli incroci (?). È come se, raggiunto il livello tetraploide negli ovociti, una successiva fecondazione (colla quale il corredo del nuovo zigote si incrementa di 1 genoma) facesse scattare un meccanismo comportante duplicazione nella linea femminile ed eliminazione in quella maschile, caratteri che appaiono sempre fra loro legati.

Si deve presumere che a tale identica manifestazione fenotipica corrispondano genotipi complessi e diversi fra loro. Si può infatti ammettere che tutti i discendenti ad ovociti tetraploidi abbiano ricevuto gli stessi geni (in rapporto alla realizzazione del ciclo cromosomico); ma è assai più difficile pensare che, dopo meiosi, tali geni si ritrovino sempre nell'uovo maturo; si tenga poi presente che gli spermi sono genotipicamente diversi.

Non bisogna inoltre dimenticare la possibile interazione fra fattori del biotipo diploide e fattori del biotipo triplo-esaploide, in quanto nel primo (come già si è visto per *D. benazzii*) vi può essere duplicazione del corredo degli elementi femminili, i quali però degenerano tutti e non scendono nei bozzoli (PIERAGNOLI 1954). La duplicazione pare pertanto fissarsi in presenza di fattori del biotipo triplo-esaploide.

Si noti che la pseudogamia, pur caratteristica dei biotipi poliploidi raccolti

(?) Anche la R_5 e la R_6 , ottenute sempre da reincrocio col parente diploide funzionante da maschio, presentano duplicazione ed eliminazione; gli elementi femminili che ho potuto studiare sono stati pochi e perciò non so se la duplicazione è totale per tutti gli ovociti dei bozzoli; si aggiunga poi l'inconveniente che a questi alti livelli di ploidia vi è sovente eliminazione cromosomica (PUCCINELLI 1960) per cui non è possibile stabilire con certezza il corredo iniziale degli ovogoni.

in natura, non è invece legata, negli ibridi di laboratorio, al tipo del ciclo cromosomico nè alla poliploidia, potendosi avere, in detti ibridi, ovociti diploidi, tetraploidi, esaploidi ecc., sia anfimittici che pseudogamici.

Questa nota rappresenta solo un breve riassunto di osservazioni scaturite dallo studio delle nostre colture; sarà necessario adesso approfondire le indagini, sceverando i fenomeni connessi coi cicli cromosomici ed in primo luogo occupandoci della manifestazione ereditaria della duplicazione cromosomica, che tanta importanza pare giocare nella realizzazione dei cicli stessi.

BIBLIOGRAFIA

- BENAZZI M., 1957. — *Cariologia di Dugesia lugubris* (O. Schmidt) (*Tricladida paludicola*). *Caryologia*, **10**: 276-303.
- , 1960. — *Ulteriori ricerche sui poliploidi sperimentali della planaria Dugesia lugubris* (O. Schmidt). *Caryologia*, **12**: 414-438.
- BENAZZI M. e BENAZZI LENTATI G., 1956. — *Ricerche su incroci tra biotipi diploidi e poliploidi di planarie*. *Atti Soc. Tosc. Sc. Nat., Mem.*, **62** (Ser. B): 130-138.
- , 1959. — *Ricerche su ibridi tra i biotipi diploide e triplo-esaploide della planaria Dugesia lugubris*. *Atti Soc. Tosc. Sc. Nat., Mem.*, **66** (Ser. B): 45-57.
- BENAZZI LENTATI G., 1956. — *Anfigonia in tricladi diploidi e comportamento dello spermio in incroci fra biotipi diploidi anfigonici e poliploidi pseudogamici*. *Arch. Zool. Ital.*, **41**: 113-128.
- BENAZZI LENTATI G., POCHINI N. e SALINI M., 1956. — *Analisi del corredo cromosomico di ibridi fra biotipi diploide e poliploide di Dugesia benazzii*. *Atti Soc. Tosc. Nat., Mem.*, **63** (Ser. B): 35-46.
- BENAZZI LENTATI G. e PUCCINELLI I., 1959. — *Ulteriori ricerche sugli ibridi fra biotipo diploide e biotipo tetraploide di Dugesia benazzii: produzione di individui triplo-esaploidi*. *Caryologia*, **12**: 110-131.
- PUCCINELLI I., 1961. — *Variazioni del numero cromosomico e meccanismi di eliminazione cromosomica in poliploidi sperimentali della planaria Dugesia lugubris* (O. Schmidt). *Acta Embryol. Morphol. Experim.*, **4**: 1-17.

Per i lavori anteriori al 1954 si veda: BENAZZI M., 1954. — *Un decennio di ricerche carilogiche sulle planarie*. *La Ricerca Scientifica*, **24**, n. 5: 2-6.

SUMMARY

In *Dugesia benazzii*, the cross between a female of diploid biotype and a male of tetraploid biotype may give rise to an offspring triploid in the somatic line, hexaploid in the female germ line and diploid in the male germ line. The F_1 chromosome cycle is quite different from that of the paternal biotype which, however, furnished two haploid chromosome sets.

These F_1 individuals are, like their paternal biotype, pseudogamic, but their mechanism of pseudogamic development shows differences with respect to the paternal biotype.

Similar triplo-hexaploid chromosome cycle is also present in progenies from inbred R_1 specimens (obtained from a normal diploid female mated with an F_1 male) and in R_2 individuals derived from an R_1 female and a male of diploid biotype.

In *Dugesia lugubris*, by crossing females of diploid biotype with triplo-hexaploid males,

diploid individuals arise which are sometimes tetraploid in their female germ line. The successive generations, obtained through either inbreeding or backcrosses to the diploid parent, are made up of triploid specimens in which the hexaploid chromosome cycle in the female germ line and the diploid one in the male germ line is repeated. The triplo-hexaploid hybrids of *D. lugubris* are not always pseudogamic; thus indicating that pseudogamy is not necessarily associated with such a kind of chromosome cycle.

It seems likely that the triplo-hexaploid cycle in the two species, accompanied by chromosome elimination in the male germ line, is a phenotypic expression of complex genotypes differing among themselves.

RIASSUNTO

In *Dugesia benazzii* l'incrocio fra femmina del biotipo diploide e maschio del biotipo tetraploide può dare origine a nati triploidi nel corredo somatico, esaploidi in quello femminile e diploidi in quello maschile. Le caratteristiche del ciclo cromosomico di questi nati sono del tutto diverse da quelle del biotipo paterno, dal quale hanno pur ricevuto due assetti aploidi.

Essi, come il biotipo paterno, sono pseudogamici, ma anche il meccanismo di sviluppo pseudogamico rivela differenze rispetto al biotipo paterno.

Ciclo triplo-esaploide consimile si verifica pure nei discendenti dall'incrocio fra individui R_1 (nati da femmina del biotipo diploide, fecondata da maschio F_1) e nella R_2 (nata da femmina R_1 , fecondata da maschio del biotipo diploide).

In *Dugesia lugubris* l'incrocio fra femmina del biotipo diploide e maschio del biotipo triplo-esaploide origina individui diploidi, i quali presentano talvolta linea femminile tetraploide. Le generazioni successive ottenute o da incrocio o da reincrocio (col parente diploide) sono costituite da individui triploidi in cui si ripete il ciclo con esaploidia nella linea femminile e diploidia in quella maschile. Gli ibridi triplo-esaploidi di *D. lugubris* non sono sempre pseudogamici, dimostrando che la pseudogamia non è necessariamente legata a tale tipo di ciclo.

Parrebbe presumibile che nelle due specie il ciclo triplo-esaploide con eliminazione nella linea maschile sia manifestazione fenotipica di genotipi complessi e fra loro diversi.



CYTOLOGICAL STUDIES IN *BEGONIA* - II

ARUN K. SHARMA and U. C. BHATTACHARYYA

Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University, India

Received: 30th September 1960

INTRODUCTION

The importance of the cytological investigations of the genus *Begonia* has already been emphasized in a previous paper (SHARMA and BHATTACHARYYA 1957). It has been shown that the species of the genus vary widely with regard to their chromosome number, though a gross similarity in the morphology of the chromosomes is remarkable. Numerical variations not only differentiate one species from another but even varieties of the same species show difference in chromosome number (*vide* DARLINGTON and WYLIE 1955). The origin of such variations (SHARMA and BHATTACHARYYA 1957) has been traced mainly in the somatic tissue, where a good deal of inconstancy in chromosome number has been noted. These abnormalities have been found to affect the germinal line as most of the species and varieties are characterized by meiotic irregularities as well. Seedlessness, resulting from the ineffective gametes, has been brought about through the accumulation of abnormalities in the somatic tissue, which otherwise would have been eliminated during selection. Extremely effective means of vegetative reproduction has contributed to the origin of its several species, through the participation of the altered nuclei of the somatic tissue in the making of daughter shoots.

Even now a large number of species and varieties of *Begonia* are remaining uninvestigated. All these species and varieties are reproduced principally through vegetative means. Cytological data of the species, so far investigated, show that morphological differences of the phenotype are always associated with numerical change in the chromosome number. In view of this fact it was thought desirable to work out the cytology of other species and varieties, both wild and cultivated, as well as to note whether here too, their cytology can be correlated with their morphological differences. Another object of undertaking this investigation was to find out the lowest chromosome number in this genus which would be helpful in tracing the evolutionary pattern. This is considered necessary as majority of the species and varieties dealt with in the previous communicate revealed heavy meiotic irregularities, suggesting their derived nature.

MATERIALS AND METHODS

Materials. — The materials for the present course of study includes the following eight species and varieties of *Begonia*, viz.

1. *Begonia paupercula* King.
2. *B. rex* Putz. (var. I).
3. *B. rex* Putz. (var. II).
4. *B. rex* Putz. (var. III).
5. *B. malabarica* Lam.
6. *B. laciniata* Roxb. (var. I).
7. *B. laciniata* Roxb. (var. II).
8. *Begonia* sp.

The members of the genus *Begonia* are horticultural plants with lovely coloured flowers and characteristic ornamentation of their foliage. Temperate regions of the Himalayas are the abode of a large number of wild species and a number of them has both the vegetative and seed producing contrivances for their widespread and successful distribution. A considerable number of varieties of the different species are so distinctive in their morphological features that a thorough revision of the nomenclature is necessary.

The plants which have been studied here were collected from different localities. *B. paupercula* was collected from Darjeeling at an altitude of 6,500 ft. and one of the varieties of *B. laciniata* from Shillong (5,800 ft.) As the plants were collected just before winter, not much difficulty was encountered in growing them in the plains. Soil, water and shade were adjusted so as to afford a more or less natural environment for their growth. The remaining members were collected from the local nursery.

Watering at frequent intervals is absolutely necessary. Water logging on the other hand is detrimental to most of them and a thorough drainage is required for their successful growth. For this purpose a special preparation of soil along with gravel, leaf manure, sand and boiler refuse was made to grow the plants.

Methods. — A great deal of difficulty had to be encountered in studying the somatic chromosomes of *Begonia*, due to the slenderness of the roots and heavy cytoplasmic inclusions. Due to small size of the chromosomes and heavy precipitation of the secreted materials on the root surface, karyotype analysis from permanent preparations could not be obtained even after the application of a number of pretreating reagents and fixation in metallic and non-metallic fixatives.

For temporary squash method, trials involving various pretreating agents, viz., p-dichlorobenzene, coumarin, aesculin and oxyquinoline were made but best results were obtained with p-dichlorobenzene (SHARMA and MOOKERJEE 1955).

Comparatively healthy root tips were treated in saturated solution of p-dichlorobenzene for two and half hours at 10-14° C. They were then fixed in acetic-alcohol (1:1) for one hour and heated in a mixture of 2% aceto-orcin and N/HCl (9:1). Subsequently, smearing was done in 1% aceto-orcin solution, applying a uniform

pressure over the cover slip. All the species and varieties were treated in the same manner, for a detailed analysis of somatic chromosomes.

Meiotic studies have been done on five of the species mentioned previously. The remaining three did not produce flowers. For meiotic studies temporary carmine smear method was found to be unsuitable. Except *B. malabarica*, meiotic studies were made from permanent preparations, best results being obtained by fixing flower buds in Navashin's fluid A and B (1:1). A pretreatment in Carnoy's fluid (3:1:1) for a few seconds following rinsing in water was found to be more effective. Following the usual schedule, paraffin blocks were prepared and sections were cut 14 μ thick. The slides were stained in Newton's crystal violet with 15-30 seconds mordanting in potassium iodide-Iodine solution.

The peak period of division for the somatic and meiotic cells was between 11 A.M. and 2 P.M.

Figures were drawn at a table magnification of approximately $\times 2900$ using an Olympus compensating eyepiece of $\times 20$ and 1.3 apochromatic objective with an planatic condenser. In the figures the chromosomes with secondary constrictions are drawn by outline.

OBSERVATIONS

The somatic chromosome number of the different species so far investigated has been found to range from twenty to thirty-four. A large number of nuclei has been recorded to possess varying number of chromosomes either lower or higher than the normal number, in the somatic tissue containing the normal number. Such variations have been found to occur at random. In such cells, the number which has been found to be present in the highest frequency of the nuclei has been regarded as the normal one. The same type of variations of chromosome number have been recorded within different species.

A casual observation of the somatic chromosomes of two varieties of *Begonia gigantea* Wall. showed three metaphase plates having 28, 32 (with six satellited chromosomes) and 34 (with four satellited chromosomes) in one and 40 and 42 (six satellited chromosomes) chromosomes in the other. As a constancy of chromosome number could not be seen the detailed karyotype analysis of the normal number has been deferred.

A detailed karyotype analysis of the different species and varieties reveals gross similarity in the chromosome complements of the different members. They are distinguishable from one another by minor differences in the details of the chromosome structure, including the secondary constrictions. Chromosomes are in general very short in length and the size difference is not so marked, ranging from 2.4 μ to 2.8 μ . Structural alterations in chromosomes in different metaphase plates within the same species have been noted in nuclei otherwise showing the normal number.

On the basis of their length the chromosomes can be divided into three

groups, viz. comparatively long, medium and short. Longer chromosomes are generally provided with secondary constrictions at various positions on their arms. Medium and short chromosomes are generally characterized by median to submedian primary constrictions. The number of chromosomes with secondary constrictions ranges from six to eight.

It has been pointed out in a previous communique (SHARMA and BHATTACHARYYA 1957) that the different species of *Begonia* show a tendency towards dioeciousness by the sterilization of the staminate flowers which is evidenced through the meiotic studies and occurrence of sterile pollens. The plants investigated at present are all monoecious, yet, simultaneous development of both staminate and pistillate flowers within the same inflorescence has not been observed and complete sterilisation of any one type of flowers has not been seen within the species studied at present. A high percentage of meiotic irregularities has been noted in most of the species, in both the first and the second meiotic divisions manifested by lagging, non-disjunction, early and unequal separation. Even in the germinal line migration of variant nuclei from the somatic cells has taken place ultimately giving rise to P.M.C.s with altered chromosomes corresponding exactly to the variation number. Similar observations have been previously recorded in the Palms (SHARMA and SARKAR 1956). A tendency towards secondary association has been noted in *B. malabarica*, which, however, due to the lack of sufficient amount of data is not reported at present.

In spite of repeated trials the somatic chromosomes of *B. semperflorens* did not show any clear morphology and as a result karyotype analysis could not be made at present. Stainability of the meiotic chromosomes towards crystal violet on the other hand has been found to be normal. But due to the presence of a varying number of multivalents and univalents a definite count could not be made. However, in *B. semperflorens* var. « red » the total number of univalent and bivalents showed 40-46 chromosomes and in one of the second metaphase plates 21 chromosomes were observed. In another variety with pink flowers 17 bivalents in first metaphase polar view have been noticed, the same number of chromosomes were also seen in second metaphase. In both the varieties, however, the dividing P.M.C.s showed extreme meiotic irregularities by showing a large number of univalents, lagging chromosomes, early separation and non-disjunction during the first and second anaphase. Consequently, high percentage of pollens (70% - 80%) appeared deformed and unstained.

Karyotypes of all the species investigated in the present paper reveal that on the basis of gross morphological features a number of chromosome types are common to all of them. A critical analysis, however, shows that minor alterations in the representatives of the types are met with in different species which may be considered as criteria for the identification of these species. So, it will be convenient to describe the general types separately in the beginning and to de-

with their finer differences under karyotype description for each species. The size difference between members of the complement is not very marked. Because of the slow gradation in size, one type gradually merges to other. The main types which have been noted are as follows:

Type A - Consists of comparatively long chromosomes with two constrictions, one primary and the other secondary. One of the constrictions is nearly median and the slightly shorter arm is provided with a satellite.

Type B - Represented by nearly long chromosome with two constrictions, one primary and the secondary. One of the constrictions is submedian and the other one located at the distal end of the longer arm.

Type C - Comprises nearly medium sized chromosome with a median primary constriction and a satellite at the distal end of one arm.

Type D - Is characterized by medium sized chromosome with two constrictions, one primary and the other secondary. One of the constrictions is submedian and the other one located at the distal end of the longer arm. This type is shorter than B type.

Type E - Consists of medium sized chromosome with two constrictions, one primary and the other secondary. One of the constrictions is submedian and the other subterminal on the longer arm.

Type F - Represented by medium sized chromosome with submedian primary constriction.

Type G - Nearly medium sized chromosome with median primary constriction.

Type H - Is characterized by medium to nearly short chromosome with submedian primary constriction. This type grades slowly in between F and J type described above and below.

Type I - Consists of medium sized chromosome with submedian primary constriction.

Type J - Represented by short chromosome with submedian primary constriction.

Type K - Comprises short chromosome with median primary constriction.

« *Begonia pauperula* » King. ($2n = 22 = B_2 + D_2 + E_2 + F_2 + H_4 + J_8 + K_2$)

Plants rhizomatous, herbaceous, creeping, leaves nearly cordate unequal at the base; margin slightly serrated and moderately lobed, bright green, very glossy, thick and more or less fleshy; flowers few, on a moderately long stalk, white with light red tinge.

The normal somatic chromosome number of the species has been recorded to be $2n = 22$ (Fig. 1). The general appearance of the chromosomes is very short and size difference is not at all marked (Fig. 1a).

The detailed karyotype analysis on the basis of length and positions of the primary and secondary constrictions may be represented through the following table:

TABLE I

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
B	1	2.1	Slightly shorter than normal B type. The primary constriction nearly median in position.
D	1	1.8	
E	1	1.6	
F	1	1.8	
H	2	1.4	
J	4	1.0 to 1.2	
K	1	1.2	

In addition to the normal number described above variation in chromosome number has been found to occur in a large number of nuclei. Clear metaphase plates showing 18, 24 and 30 chromosomes (Figs. 2, 3 and 4) were observed.

Meiosis in this species shows considerable irregularities in the P.M.C.s, but they are in general less than the other species studied. Diakinesis shows clear 11 bivalents. A tendency towards early separation in some the pairs has been noticed (Fig. 25). Clear 11 chromosomes in second metaphase polar view could be recorded (Fig. 26). Unequal separation showing 10 chromosomes in one pole and 12 in the other in second metaphase polar view has been seen (Fig. 27). Laggards in second anaphase (Fig. 28) and instances of formation of pentads instead of tetrads, have been noticed (Fig. 29).

« *Begonia rex* » Putz. (var. I). ($2n = 22 = C_2 + E_4 + G_2 + H_4 + J_6 + K_4$)

Stem rhizomatous, prostrate, fleshy; leaves 4-6 in., dull sagegreen, petiole fairly long, glabrous, leaves with few hairs beneath; inflorescence elevated on a stalk, enclosed by thin scarious bracts, flowers pinkish white, uniform, with 4 perianth leaves, outer segments with few scattered hairs; seed formation in some cases noticed.

The somatic chromosome number of this variety has been recorded as



Figs. 1 and 1a. — Normal somatic metaphase showing $2n = 22$ chromosomes and idiogram respectively in *Begonia paupercula* King.

Figs. 2-4. — Variation somatic metaphase plates showing 18, 24 and 30 chromosomes respectively in *B. paupercula* King.

Figs. 5 and 5a. — Karyotype showing $2n = 22$ chromosomes and idiogram respectively in *B. rex* Putz. (var. I).

Figs. 6-7. — Somatic variations showing 18 and 23 chromosomes in *B. rex* Putz. (var. I).

Figs. 8 and 8a. — Normal somatic metaphase showing $2n = 32$ chromosomes and idiogram respectively in *B. rex* Putz. (var. II).

Figs. 9 and 10. — Variation somatic metaphase plates showing 28 and 31 chromosomes in *B. rex* Putz. (var. II).

$2n = 22$ (Fig. 5). The complement shows markedly small type of chromosomes with negligible size difference (Fig. 5a).

On the basis of size taken together with the positions of constrictions, the somatic chromosomes may be analysed through the following table:

TABLE II

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
C	1	1.8	
E	2	1.4 to 1.5	
G	1	1.6	
H	2	1.2 to 1.4	
J	3	0.9 to 1.0	
K	2	0.9 to 1.0	

Along with the normal number ($2n = 22$) noted above, cells containing 18 and 23 chromosomes have also been observed as variations (Figs. 6 and 7).

Abnormalities in meiosis are not very marked and fairly normal division has been recorded in this variety. Diakinesis shows 22 chromosomes. However, instead of normal pairing, a tendency for early separation has been noted (Fig. 30). Univalents and early separation (Fig. 31) have been observed. Non-disjunction of bivalents in varying numbers have been recorded (Figs. 32 and 33). Bivalents and univalents lagging in the equatorial region of the P.M.C.s. have been noted (Fig. 34).

Second metaphase polar view showing 11 chromosomes in one of the poles has been clearly seen (Fig. 35).

Variations occurring even within the P.M.C.s have also been noted. In one of the pollen mother cells 10 clear chromosomes have been counted in both the poles (Fig. 36).

« *Begonia rex* » Putz. (var. II). ($2n = 32 = C_4 + D_4 + F_2 + G_2 + H_4 + I_2 + J_4 + K_4$)

Stem rhizomatous, soft, creeping, with leaves arranged in two rows on the dorsal surface with erect petioles, leaves 4-8", obliquely cordate, upper surface nearly smooth with dark green margin and white in the centre, veins beneath brown with scattered hairs; flowers white with 4 perianths, outer marked with pink colour; flowers smooth.

The somatic chromosome number of the species has been found to be $n = 32$ (Fig. 8). Chromosome size on an average is quite small and the size difference is not at all marked (Fig. 8a).

On the basis of the detailed karyotype analysis the somatic chromosomes may be described in the following tabular form:

TABLE III

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
C	2	1.8	
D	2	1.8	
F	1	1.6	Comparatively shorter than normal F type and nearly comparable to H type.
G	1	1.6	
H	3	1.2 to 1.3	Smaller H types nearly comparable to J type.
I	1	1.4	Comparatively shorter than normal I type.
J	4	0.9 to 1.0	
K	2	0.9 to 1.0	

In addition to the normal number ($2n = 32$) mentioned here, clear metaphase plates containing 28, 31 and 34 (Figs. 9, 10 and 11) as variations have been observed in several cells.

Extreme meiotic abnormalities have been recorded in this variety. Bivalents and univalents occurring in varying numbers during diakinesis and a tendency towards early separation could be seen (Figs. 37 and 38). However, the total number of bivalents and univalents shows the presence of 32 chromosomes. First metaphase polar view shows 16 bivalents (Fig. 39). Early separation in metaphase (Fig. 40) and bivalent laggings have been found to occur in high percentage (Figs. 41 and 42) during anaphase. Presence of a trivalent and several univalents could also be seen during first anaphase (Fig. 43). About 65% pollen sterility has been noticed.

« *Begonia rex* » Putz. (var. III). ($2n = 34 = C_2 + D_2 + E_2 + F_2 + G_2 + H_2 + I_2 + J_2 + K_2$)

Stem rhizomatous, creeping; soft, leaves oblique, cordate, acuminate, glabrous above and slightly hairy beneath; upper surface silvery white, veins

underneath reddish; inflorescence smooth; flowers white with four perianth segments, lower two with reddish touch.

The somatic chromosome number of this variety has been determined to be $2n = 34$ (Figs. 12 and 12a).



Fig. 11. — Variation somatic metaphase showing 34 chromosomes in *Begonia rex* Putz. (var. II).

Figs. 12 and 12a. — Karyotype showing $2n = 34$ chromosomes and idiogram respectively in *B. rex* Putz. (var. III).

Figs. 13 and 14. — Variation somatic metaphase plates showing 28 and 32 chromosomes in *B. rex* Putz. (var. III).

Figs. 15 and 15a. — Normal somatic complement showing $2n = 28$ and idiogram respectively in *B. malabarica* Lam.

Fig. 16. — Variation somatic metaphase showing 24 chromosomes in *B. malabarica*.

On the basis of size and position of primary and secondary constrictions the detailed karyotype may be described through the following table:

TABLE IV

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
C	1	1.9	Comparatively shorter than normal C type.
D	1	2.0	Slightly shorter than normal D type.
E	1	2.1	
F	4	1.7 to 2.1	One of the F types is nearly comparable to G type.
G	1	1.4	
H	2	1.4	Fairly comparable to G type.
I	1	1.6	
J	3	1.0	Position of the submedian constrictions slightly variable.
K	3	0.9 to 1.0	

In addition to the normal karyotype described above showing $2n = 34$ chromosomes, nuclei showing variation numbers with $2n = 28$ and 32 (Figs. 13 and 14) could be clearly seen. Structural alterations of chromosomes, in plates otherwise showing the normal number, has also been recorded.

« *Begonia malabarica* » Lam. ($2n = 28 = A_2 + C_2 + E_2 + H_{10} + J_8 + K_4$)

Stem erect, 2-3 ft., reddish, glabrous, succulent with distinct nodes and internodes; leaves oblique, 3-8 inches long and 2-3 inches broad near the base, slightly cordate-cuneate, acute to nearly acuminate, slightly serrated, hispid on both surface, upper surface green and reddish beneath, leaves sparsely arranged with, 2-3 inches petiole, stipules scarious, adnate; flowers light pink, nearly round with two perianth leaves, arranged in axillary cyme and pendulous; anthers biseriate forming a flat and compact structure.

The normal somatic chromosome number of this species has been found to be $2n = 28$ (Figs. 15 and 15a).

In the following table the detailed karyotype is summarized:

TABLE V

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
A	1	2.5	
C	1	1.6	Comparatively smaller than normal C type.
E	1	1.9	
H	5	1.2 to 1.4	Some of the H types nearly comparable to G type.
J	4	1.8 to 1.2	
K	2	0.7 to 1.0	

In addition to the normal number described above variation nuclei with 24, 30 and 34 chromosomes have been observed (Figs. 16-18). Considerable structural alterations within the variation numbers and even within the normal number could be seen.

Meiosis shows high degree of irregularities. Diakinesis shows 14 bivalents with a tendency for grouping of bivalents (Fig. 44). In second metaphase polar view clear separation of 14 chromosomes in each pole has been observed (Fig. 45). In the second division also, a tendency of chromosome association is quite marked. Laggings, non-disjunction of bivalents and late separation have been frequently observed during first anaphase (Figs. 46 and 47). About 50% pollen grains have been found to be empty and deformed.

Figs. 17 and 18. — Variation somatic numbers showing 30 and 34 chromosomes in *Begonia malabarica* Lam. respectively.

Figs. 19 and 19a. — Normal somatic metaphase showing $2n = 20$ chromosomes and idiogram respectively in *B. laciniata* Roxb. (var. I).

Fig. 20. — Variation somatic metaphase showing $2n = 22$ chromosomes in *B. laciniata* Roxb. (var. I).

Figs. 21 and 21a. — Karyotype showing $2n = 22$ chromosomes in *B. laciniata* Roxb. (var. II) and idiogram respectively.

Fig. 22. — Variation somatic metaphase showing $2n = 20$ chromosomes in *B. laciniata* Roxb. (var. II).

Figs. 23 and 23a. — Normal somatic metaphase showing $2n = 28$ chromosomes in *Begonia* sp. (unidentified) and idiogram respectively.

Fig. 24. — Variation somatic metaphase showing $2n = 26$ chromosomes in *Begonia* sp. (unidentified).



17



18



19

19a

•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
A	D	E	F	G	H	H	I	J	K		



20



21



22

21a

•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
A	B	E	G	G	G	H	H	I	J	K	



23



24

23a

•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
D	D	D	D	F	F	G	G	G	G	H	H

« *Begonia laciniata* » Roxb. (var. I). ($2n=20=A_2+D_2+E_2+F_2+G_2+H_1+I_2+J_2+K_2$)

Stem erect, 8-24 inches long, brown-tomentose with creeping root stock; leaves 4-8 in. diameter, lobes many, cordate acuminate, both surface pubescent, more or less villous.

The normal somatic chromosome number of this species has been found to be twenty (Figs. 19 and 19a).

The following table is an outline of the results of karyotype analysis:

TABLE VI

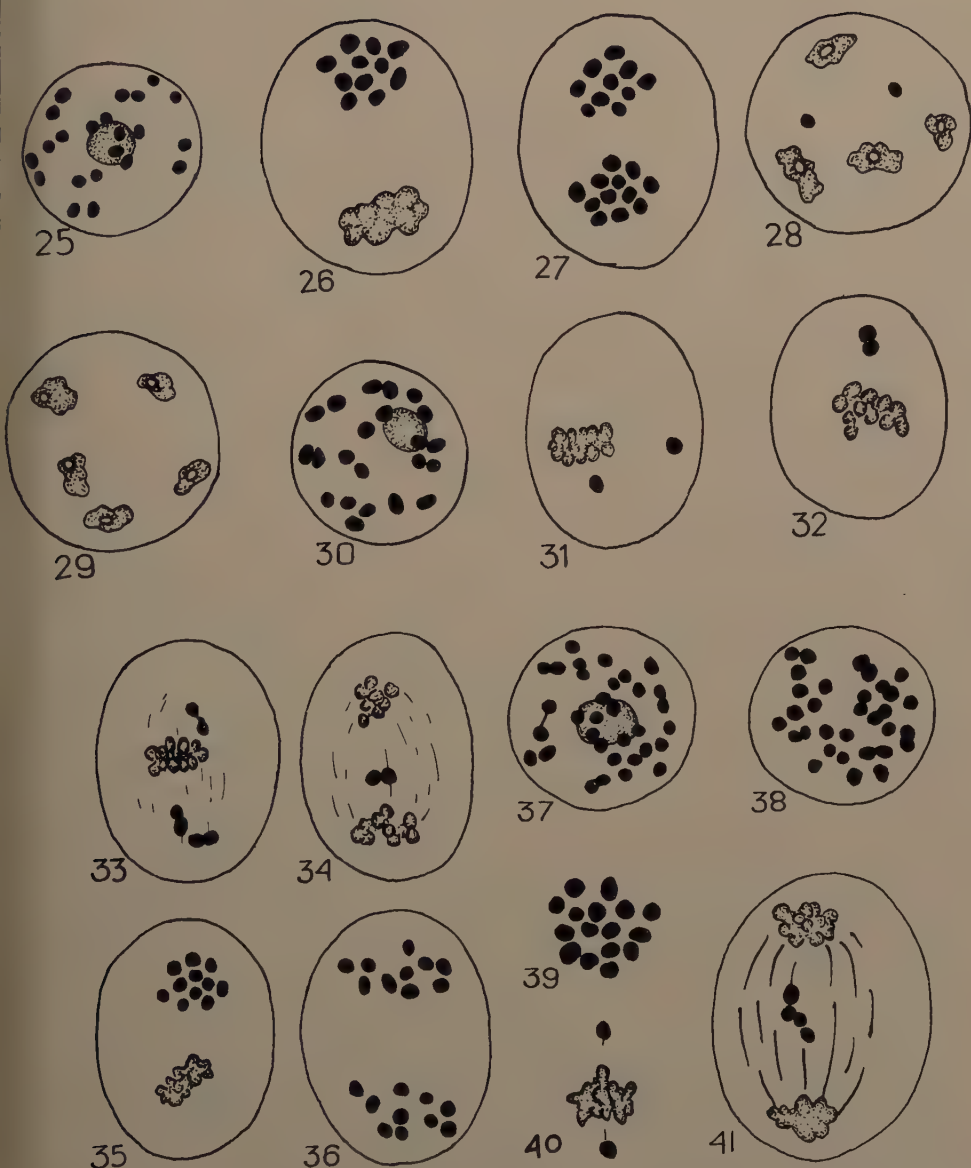
Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
A	1	2.5	
D	1	1.8	Comparatively shorter and nearly comparable to E type.
E	1	1.8	Slightly shorter than normal E type.
F	1	1.8	Comparatively shorter than normal F type.
G	1	1.9	
H	2	1.4 to 1.5	
I	1	1.7	
J	1	1.2	
K	1	1.2	

In addition to the normal complement, structural alterations of chromosomes otherwise showing the normal number have also been noted. A variation plate containing $2n = 22$ chromosomes has been recorded (Fig. 20).

« *Begonia laciniata* » Roxb. (var. II). ($2n=22=A_2+B_2+E_2+G_2+H_1+I_2+J_2+K_2$)

Stem erect with creeping root stock, 6-12 inches long, succulent, slightly hairy, with distinct nodes and internodes; leaves fairly large, with long coalescent petiole, nearly glabrous, upper surface greyish green, acutely lobed, lobes many, margin finely dentate, inflorescence smooth, enclosed by papery bracts, buds and flowers smooth, white, with 4 perianth segments.

The normal somatic chromosome number of this species has been found to be twenty-two (Figs. 21 and 21a).



Figs. 25-29. — Meiotic stages in *Begonia paupercula* King. (For details vide text).

Figs. 30-36. — Meiotic stages in *B. rex* Putz. (var. I). (For details vide text).

Figs. 37-41. — Meiotic stages in *B. rex* Putz. (var. II). (For details vide text).

The detailed karyotype analysis on the basis of length and position of primary and secondary constrictions may be described in the following tabular form:

TABLE VII

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
A	1	2.5	
B	1	2.4	
E	1	1.8	
G	3	1.4 to 1.8	One pair slightly shorter than normal G type.
H	2	1.4	
I	1	1.8	
J	1	1.2	Nearly comparable to H type.
K	1	1.0	

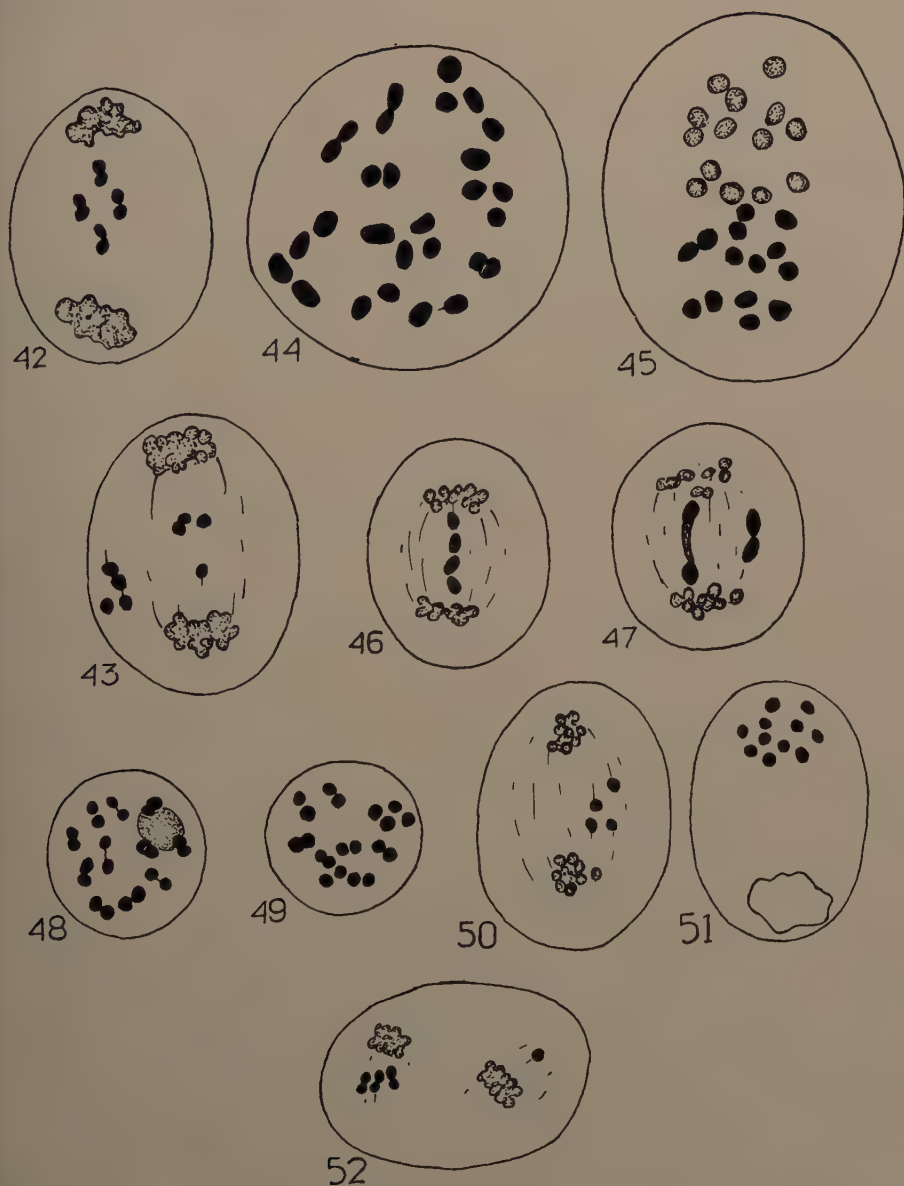
In addition to the normal number described above, variation nuclei showing twenty chromosomes have been observed (Fig. 22).

Meiosis in this variety has been found to be extremely irregular and the migration of variant nuclei in the germinal line has been noted in this variety. Diakinesis shows clear 11 bivalents and a slight tendency towards early separation has been noted (Fig. 48). In one of the P.M.C.s 10 clear bivalents have been observed (Fig. 49). Lagging of bivalents and univalents (Fig. 50) in large numbers has been observed during first anaphase. In second metaphase polar view clear 11 chromosomes have been counted in one pole (Fig. 51). Instances of early separation and non-disjunction of chromosomes have also been noted in second metaphase (Fig. 52).

« *Begonia* sp. » (unidentified). ($2n = 28 = D_8 + F_4 + G_{10} + H_6$)

Stem rhizomatous, soft, with leaves arranged in two rows on the dorsal surface; leaves very large 6-10 in. diameter with long petiole, 8-10 in. long; petiole thick villous, about 1/2" in diameter, hairs long on the petiole, palmate, acutely lobed giving the appearance of a cucurbitaceous leaf, comparatively thick with slight dentation in the margin.

This species shows great resemblance with the Herbarium specimen identified as *B. rex* in Shibpore National Herbarium, though exact representation of this type is not available in the sheets. However, the description of *B. rex*, does



Figs. 42 and 43. — Meiotic stages in *Begonia rex* Putz. (var. II). (For details vide text).

Figs. 44-47. — Meiotic stages in *B. malabarica* Lam. (For details vide text).

Figs. 48-52. — Meiotic stages in *B. laciniata* Roxb. (var. II). (For details vide text).

not fit in well with the individual studied here. As such the exact specific identification of this individual has been kept in abeyance till final confirmation from other authorities.

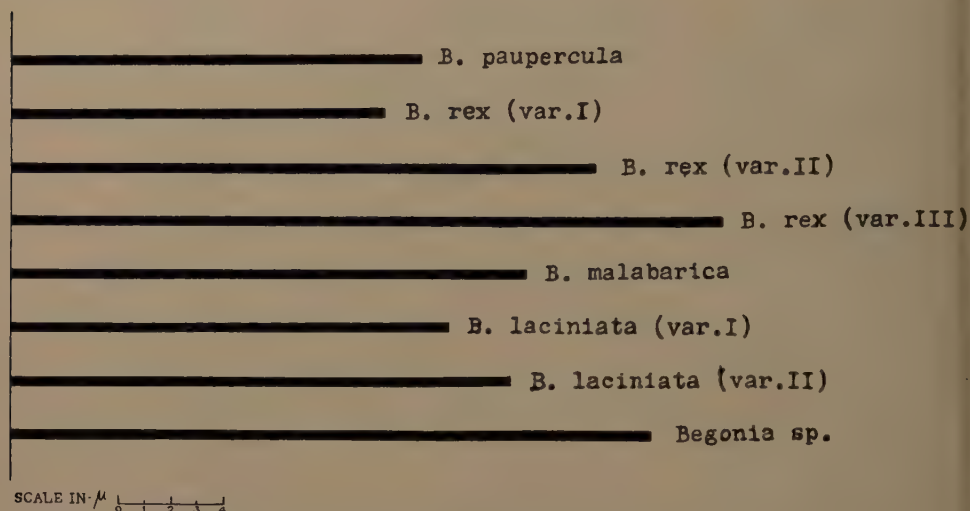


Fig. 53. — Histogram showing half the total amount of chromatin matter in different species and varieties of *Begonia*.

The normal somatic chromosome number of the species has been found to be twenty-eight (Figs. 23 and 23a).

In the following table the details of the karyotype are summarized:

TABLE VIII

Type	No. of pairs	Length in μ	Special features
D	4	1.8 to 2.1	
F	2	1.7	Comparatively shorter than normal F type.
G	5	1.4 to 1.8	The smaller G types nearly comparable to K type.
H	3	1.2 to 1.4	Two pairs comparatively shorter than normal H type.

In addition to the normal number described above, variation nuclei showing clear twenty-six chromosomes have been recorded (Fig. 24).

Structural alterations of chromosomes otherwise showing the normal number have been noted in a large number of metaphase plates.

DISCUSSION

Inconstancy in number in the somatic tissue and its role in evolution.

Chromosome studies in *Begonia* show heavy variations in chromosome number in different species and varieties, similar to a previous report (SHARMA and BHATTACHARYYA 1957). In *B. rex* the present study reveals the existence of three different varieties characterized by $2n = 22$, 32 and 34 chromosomes respectively. There are distinct phenotypic differences distinguishing one from the other in minor characters of the leaf. In the previous investigation, $2n = 26$ chromosomes were reported in a variety of this species. MATSUURA and OKUNO (1943) determined the chromosome number of 6 different individuals as 32, 33, 34, 42, 43 and 44 respectively. It is evident, therefore, that *B. rex* represents an assemblage of varieties, differing from each other in minor characters of external morphology. As they differ in chromosome number too, they can be considered as cytotypes as well. This species may serve as a clear example of the correlation of morphological differences and chromosomal characteristics.

It is evident from the chromosome numbers of the different individuals reported so far that $2n = 22$ as reported here is the lowest for this species. As far as can be gathered from earlier reports (*vide* DARLINGTON and WYLIE 1955), it is the lowest also for the genus *Begonia* excepting the species *B. laciniata* reported here. The way through which the other numbers have been derived cannot, however, be stated accurately, though the role of nondisjunction cannot be ignored.

Meiosis of the two varieties studied show irregularities. Of the two, however, var. II shows comparatively more regular meiosis than the other. It is worth noting that this variety occasionally produces seeds in contrast to the absolute seedlessness of the other. The production of seeds is evidently due to the occasional production of viable gametes arising out of regular meiosis in some of the P.M.C.s. The meiotic and somatic irregularities have gradually accumulated in the tissue, once seedlessness has been attained. The loss of sexual reproduction is evidently the cause of the non-selection and retention of abnormalities within the tissue.

With regard to other species, the individuals of *B. laciniata* reported in the previous paper revealed thirty-two chromosomes. In the present work on the other hand, the two other varieties of the same species have been shown to possess $2n = 20$ and 22 chromosomes respectively. The number $2n = 20$ has not been met with in any other species and varieties of *Begonia*. The presence of such cytotypes within the same species, correlated with their morphological differences, finds parallel in *B. rex* as well.

Meiosis in the variety with $2n = 20$ chromosomes could not be studied. On

the other hand, heavy meiotic irregularities have been noted in the other variety with $2n = 22$ chromosomes. In addition to P.M.C.s having $2n = 22$ chromosomes cells have been encountered with 20 chromosomes forming 10 bivalents. It is worth noting that occasional seeds are obtained from this variety, though however, the percentage of pollen sterility is very high. The somatic cells too show 20 chromosomes in variant nuclei. Similarly in *B. laciniata* var. I, variant nuclei have been shown to possess twenty-two chromosomes in the somatic cells. As such there is every possibility of derivation of one variety from another through somatic cells during vegetative reproduction. This will involve either duplication or loss of chromosomes from the complement. In view of the presence of 20 chromosomes in P.M.C.s of *B. laciniata* and occasional production of seeds the possibility of origin of var. I from var. II through sexual means cannot be excluded. But in view of the extensive propagation through vegetative means and consequently scarce production of seeds, the origin may better be assumed to have taken place through somatic mutation.

In the other three species, viz. *B. paupercula*, *B. malabarica* and *Begonia* sp. (unidentified) the somatic chromosome numbers noted are twenty-two, twenty-eight and twenty-eight respectively. In *B. cucullata* and *B. maculata* 56 and 56 chromosomes have been reported by BOWDEN (1945) and MATSUURA and OKUNO (1936) respectively. The number $2n = 28$, reported in two species here, falls in the same line with the above two.

The presence of such varying numbers in different species and almost absolute dependence on vegetative reproduction for propagation, emphasizes once more the suggestion put forward in the previous paper, that all these varieties originated through somatic means. The regular inconstancy in chromosome number in their somatic cells bears testimony to this suggestion. Such a feature has been found to be very common in species reproducing through vegetative means (*vide* SHARMA and SHARMA 1956).

The karyotypes of the different species of *Begonia* so far investigated, show that all of them have a general resemblance in their chromosome morphology, differing, however, in minor details (*vide* idiograms and histogram). Such details involve the number and to some extent the positions of secondary constrictions in chromosomes. It is evident, therefore, that towards the speciation in this genus both numerical and structural variations have contributed to a great extent.

Possible causes leading to the survival of aneuploid forms.

A fact worth noting is regular survival of the numerically variant forms in nature. Such cytotypes with numerical variation have been noted in *B. semperflorens* in large numbers by earlier investigators (MATSUURA and OKUNO 1943) as well as in *B. laciniata* and *B. rex* by the present author. This is a fact which

though reported, is not so extensive in other species of plants reproducing through vegetative means. In most of the cases of the vegetatively reproducing plants so far reported, individuals have been obtained differing from one another, mostly with regard to chromosome structure. Though numerical variations occur in somatic complement along with the structural ones, yet they do not contribute much to the origin of new types through somatic means, as the types originating thereby have less chance of survival than those showing mere structural variations. This has been accounted for by assuming that numerically altered complements are far remote from the normal than the structurally altered ones. No doubt, such numerical variants have been noted in some of the species but the number of such species is insignificant, as compared to others.

Some explanation may be sought for, regarding the principle controlling the survival of individuals differing from the normal number in species of *Begonia*. It is quite problematic as to how deficiencies involving several chromosomes can allow survival of an individual, even though the reproduction may be purely vegetative. If such chromosomes contain the essential genes responsible for the maintenance, viability and normal metabolic level of the individuals then survival is bound to be affected. On the other hand if they contain non-essential genes whose presence may not be imperative for the survival of the individual, the consequences of their deficiencies may be less drastic. In other words, the possibilities of such chromosomes being *heterochromatic* or of an accessory type cannot be excluded. It may be pointed out that the accessory chromosomes do not always show heteropycnotic behaviour, though their behaviour on the spindle is often erratic (*vide* MÜNTZING 1948, 1949). The heavy meiotic irregularities specially manifested in the lagging and irregular separation of chromosomes in species of *Begonia* may be regarded to provide further evidence of their accessory nature. The regular meiotic division in several P.M.C.s having less than the apparently normal number of chromosomes (such as, 10 clear bivalents in *B. laciniata*, $2n = 22$), can be explained if some of the chromosomes are considered as accessory in nature. Similarly, in *B. rex*, where individuals have been reported having chromosome number $2n = 32$ to $2n = 44$, it may be regarded that such variations mostly involve the accessory chromosomes.

The question may be raised as to why some of the cytotypes as noted by the present author, differ with regard to the phenotypic character as well. If the difference involves mainly the non-essential accessory chromosomes, the qualitative character on a theoretical basis should not be affected. Not in all cases, such phenotypic differences have been recorded. Probably, in a majority of cases, the differences in chromosome complements mainly involve the heterochromatic chromosomes, but occasionally a normal chromosome can also be involved in their alterations. In such cases, the phenotypic differences are bound to arise and the type originating thereby, may represent a varietal level, if other changes

associated for its stability follow. So far as the survival is concerned, it is expected that in species having so high a chromosome number, changes in one or utmost two chromosomes may not affect viability. Whenever a heavy aneuploid difference in chromosome number between individuals appears, the possibility of accessory chromosomes being involved in alterations cannot be excluded so far as the genus *Begonia* is concerned.

REFERENCES

- BOWDEN W. M., 1945a. — A list of chromosome numbers in higher plants. I. Acanthaceae to Myrtaceae. Amer. J. Bot., **22**: 81.
- DARLINGTON C. D. and WYLIE A. P., 1955. — Chromosome atlas of flowering plants. George Allen and Unwin Limited, London.
- MATSUURA H. and OKUNO S., 1936°. — Jap. J. Genet., **12**: 42 (vide DARLINGTON and WYLIE 1955).
- MATSUURA H. and OKUNO S., 1943°. — Cytologia, **13**: 1 (vide DARLINGTON and WYLIE 1955).
- MÜNTZING A., 1948. — Cytological studies of extrafragment chromosomes in rye. Hereditas, **34**: 161-180.
- , 1949. — Accessory chromosomes of *Secale* and *Poa*. Hereditas; Suppl. vol. 402-411.
- SHARMA A. K. and BHATTACHARYYA U. C., 1957. — Cytological studies in *Begonia* - I. La Cellule, **58**: 307-329.
- SHARMA A. K. and MOOKERJEE A., 1955. — Paradichlorobenzene and other chemicals in chromosome work. Stain Tech., **30**: 1-7.
- SHARMA A. K. and SARKAR S. K., 1956. — Cytology of different species of palms and its bearing on the solution of the problems of phylogeny and speciation. Genetica, **28**: 361-488.
- SHARMA A. K. and SHARMA A., 1956. — Fixity in chromosome number of plants. Nature, **176**: 261.

SUMMARY

The present paper deals with the cytology including karyotype analysis of eight species and varieties of *Begonia*, viz. *B. paupercula* King, ($2n = 22$); *B. rex* Putz., (var. I), ($2n = 22$); *B. rex* Putz. (var. II), ($2n = 32$); *B. rex* Putz. (var. III), ($2n = 34$); *B. malabarica* Lam., ($2n = 28$); *B. laciniata* Roxb. (var. I), ($2n = 20$); *B. laciniata* Roxb. (var. II), ($2n = 22$); *B. sp.* (unidentified), ($2n = 28$). In addition to these two varieties *B. gigantea* Wall., and two varieties of *B. semperflorens*, were observed. One of the former two varieties showed $2n = 28$, 32 and 34 chromosomes and in another $2n = 40$ and 42 chromosomes were counted in the somatic tissue and the latter in meiosis showed 40 to 46 chromosomes. The implications of such aneuploid numbers have been pointed out.

The chromosomes are graded and in all the different species and varieties taken together with their general morphological features can be divided into eleven distinct types.

Variation in addition to normal chromosome number has been observed in large number of dividing cells. These are either lower or higher than the normal number. In case of *B. laciniata*, variation complement of one variety has been found to be the normal number for another variety of the same species.

Meiotic studies on five species show high frequency of meiotic abnormalities. However, a variety of *B. rex* and *B. paupercula* showed comparatively low irregularities. Variations in

° Not consulted in original.

meiosis have also been met with, which directly correspond to somatic variations. As a result of aberrant divisions, pollen sterility has been recorded to be very high (60%-70%).

Importance of somatic variations in the evolution of different species as discussed in a previous communiqué, has further been emphasized specially with reference to direct evidences obtained in *B. laciniata*. The cause of successful retention of the variation numbers within the somatic tissue has been discussed and the possibilities of their 'accessory' nature along with evidences for the same has been pointed out. The phenotypic differences within the cytotypes have been suggested to be due to the fact that alterations in such cases may involve one or two chromosomes in addition to some accessory ones.

The significance of continued vegetative propagation and migration of altered nuclei in the development of a new individual in speciation has been discussed.

RIASSUNTO

Il presente lavoro tratta della citologia con analisi del cariotipo di otto specie e varietà di *Begonia*, e cioè *B. paupercula* King ($2n = 22$), *B. rex* Putz. var. I ($2n = 22$), *B. rex* Putz. var. II ($2n = 32$), *B. rex* Putz. var. III ($2n = 34$), *B. malabarica* Lam. ($2n = 28$), *B. laciniata* Roxb. var. I ($2n = 20$), *B. laciniata* Roxb. var. II ($2n = 22$), *B. sp.* (non identificata) ($2n = 28$). Oltre a queste sono state esaminate due varietà di *B. gigantea* Wall. e due varietà di *B. semperflorens*. Delle prime due una presentava $2n = 28, 32$ e 34 cromosomi e nell'altra sono stati contati $2n = 40$ e 42 cromosomi nel tessuto somatico; le altre due presentavano da 40 a 46 cromosomi. Sono messe in evidenza le conseguenze di tali numeri aneuploidi.

In tutte le specie e varietà i cromosomi, sulla base delle loro dimensioni e principali caratteristiche morfologiche, possono essere classificati in undici tipi.

In parecchie cellule in divisione sono state osservate delle deviazioni dal normale numero cromosomico, cioè numeri cromosomici più bassi o più alti del normale. Nel caso di *B. laciniata* la variazione del corredo di una varietà è risultata uguale al numero cromosomico normale di un'altra varietà della medesima specie.

Le osservazioni sulla meiosi di cinque specie hanno messo in evidenza un'alta frequenza di anomalie meiotiche. Tuttavia una varietà di *B. rex* e una di *B. paupercula* hanno presentato delle irregolarità relativamente scarse. Sono state riscontrate anche delle variazioni nella meiosi, che corrispondono direttamente a variazioni somatiche. Come risultato delle divisioni aberranti, la sterilità del polline risulta molto alta (60%-70%).

Viene dato ulteriore risalto all'importanza delle variazioni somatiche nell'evoluzione delle diverse specie (come è già stato discusso in un lavoro precedente), con speciale riferimento alle prove dirette ottenute da *B. laciniata*. Vengono discusse le cause del mantenimento dei numeri varianti nel tessuto somatico, viene messa in evidenza la possibilità della loro natura «accessoria» e vengono date le prove di questa ipotesi. Si suppone che le differenze fenotipiche entro i citotipi siano dovute al fatto che le alterazioni in questi casi possano investire uno o due cromosomi oltre ad alcuni del tipo accessorio.

Viene discusso il significato per la speciazione della propagazione vegetativa continuata e della migrazione dei nuclei alterati nello sviluppo di un nuovo individuo.



LO SVILUPPO DEL GAMETOFITO FEMMINILE DEL *SENECIO* *LEUCANTHEMIFOLIUS* POIR. VAR. *PINNATIFIDUS* FIORI

CHIARA BANCHETTI

Istituto di Botanica dell'Università, Pisa

In Redazione: il 12 Marzo 1961

INTRODUZIONE

Lo studio del gametofito femminile del *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori è stato possibile soltanto dopo un accurato studio sistematico della varietà presa in esame.

Il *Senecio leucanthemifolius* Poir. è una specie molto polimorfa, comprendente numerose varietà morfologiche ed ecologiche. Molte forme endemiche appartengono a questa specie, fra le quali un numero notevole appartiene alla Sardegna, dove è stato raccolto e fissato il materiale appartenente alla var. *pinnatifidus* Fiori che ha le foglie pennato-partite a lacinie dentate od incise, orecchiuto-amplessicauli. Queste caratteristiche appaiono evidenti dalla Fig. 1.

La var. *pinnatifidus* (= *S. leucanthemifolius* var. *cosyrensis* Lojac. (1903) f. *major*), istituita dal FIORI (1903), è un endemismo ad ampio raggio che abbraccia la Sicilia occidentale (Trapani), Pantelleria, la Sardegna e le isole Sanguinarie presso Aiaccio in Corsica. Tale varietà è stata trovata inselvatichita anche al Piccolo S. Bernardo a 2170 m.s.m. (FIORI 1925-1929).

Le altre varietà del *Senecio leucanthemifolius* Poir. presenti in Sardegna, oltre la forma tipica, sono:

— la var. *Marmorae* (Moris), endemica della Sardegna che è considerata dal MORIS (1828) una specie a sè stante;

— la var. *vernus* (Biv.) [= *S. vernalis* Raf. (1815) non W. et K.] considerata anche questa un endemismo della Calabria, Sicilia, Isole Egadi, Malta, Lampedusa, Pantelleria;

— la var. *pedunculatus* (Fiori) (= *S. humilis* v. *pedunc.* DC., 1837; *S. leucanthemifolius* v. *Salzmanni* Rouy 1906), della Corsica, Sardegna e Marocco;

— la var. *crassifolius* (W.), che è diffusa assieme al tipo dalla Francia meridionale alla Dalmazia e a tutta l'Africa boreale;

— la var. *Reichenbachii* Fiori che è diffusa particolarmente sulle isole Pelagosa, Tremiti, Ponza, Giannutri, Figarolo (presso la Sardegna) e frequente nell'Arcipelago greco e in Algeria.

MATERIALE E TECNICA

Di questa interessante e polimorfa specie ho studiato il gametofito femminile sul materiale raccolto dal Prof. Martinoli lungo le arene marittime del Golfo di Quartu, presso Cagliari (Poetto).

Assieme agli esemplari d'erbario è stato raccolto del materiale che doveva servire per lo studio embriologico e citologico.

I capolini fissati nel liquido di Karpetschenko sono stati colorati con ematossilina ferrica, secondo il metodo di Heindenhein, e resi permanenti con il balsamo del Canada secondo la tecnica usuale.

RISULTATI

Il gametofito femminile di questa specie è del tipo normale ottonucleato. La nucella è tenuinucellata (ovuli tenuinucellati). Una sola cellula archesporiale si comporta come gonotoconte (Fig. 2).

Le cellule madri sono generalmente molto grandi e ben visibili (Fig. 3). Nella sezione di una cellula madre in divisione eterotipica ho potuto notare il numero cromosomico aploide $n = 10$. La varietà è quindi certamente diploide in quanto i numeri più frequenti nelle altre specie di *Senecio* sono: $2x = 20$; $2x = 40$; $2x = 60$. Tuttavia il numero base è, secondo i dati presi da DARLINGTON e WILIE (1955), $x = 10, 11, 12, 23$.

Il processo meiotico si conclude con la formazione di quattro megaspore (Fig. 4).

Delle quattro megaspore quella più interna della nucella è quella che dà origine al gametofito, e si accresce spingendo lateralmente le altre megaspore, che degenerano verso la parete della nucella (Fig. 5).

La megaspora più calazale appare infatti alla fine del processo di accrescimento ingrandita e vacuolizzata.

Alla vacuolizzazione segue il processo della somatogenesi, che si manifesta con una divisione nucleare (III divisione), con la conseguente formazione di un gametofito binucleato (Fig. 6) che mostra un enorme vacuolo verso il micropilo, un altro verso la calaza; al centro, in un breve territorio citoplasmatico, si osservano due nuclei molto vicini. Si scorgono a lato di questo gametofito binucleato le tre megaspore degenerate insieme ad altre cellule.

L'accrescimento del gametofito si manifesta anche con l'allontanamento dei due nuclei del binucleato, e quando l'accrescimento ha permesso al gametofito di raggiungere delle dimensioni doppie dello stato iniziale del binucleato, avviene la IV divisione nucleare (II gametogenica) con la formazione del gametofito tetranucleato (Fig. 7).

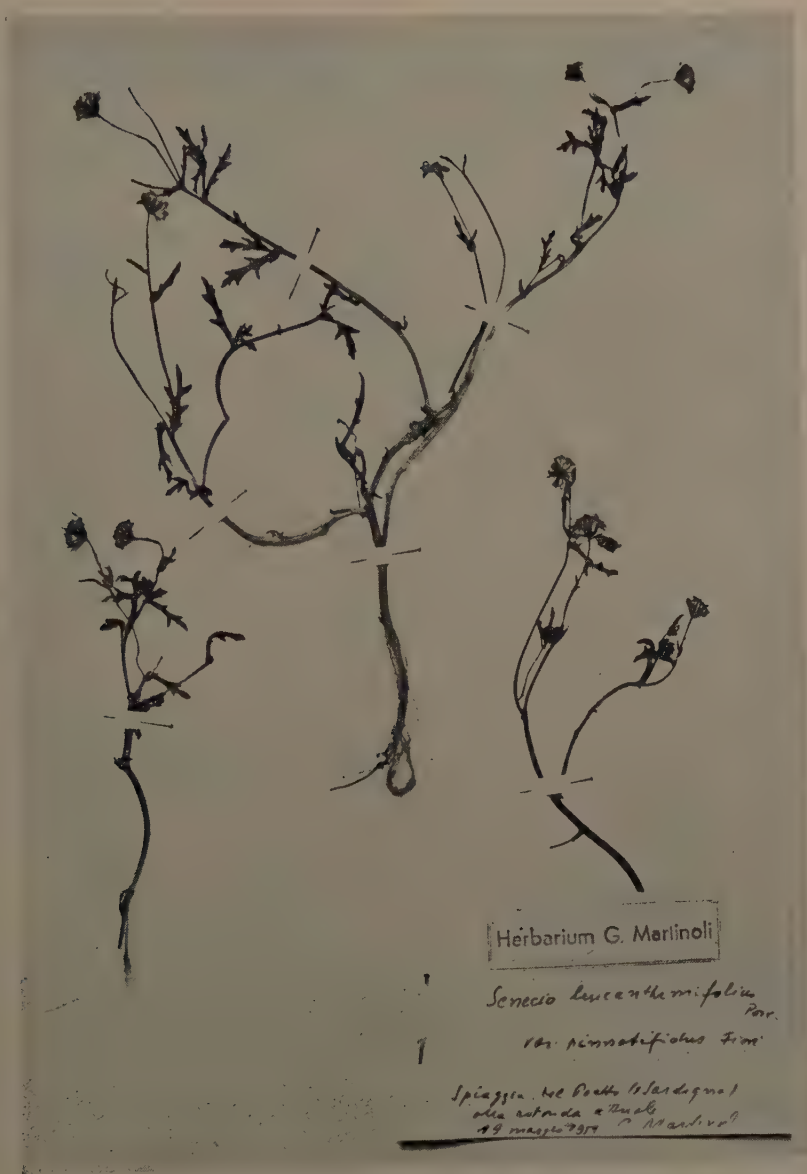


Fig. 1. — Esemplare d'erbario di *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori raccolto sulla spiaggia del Poetto (Cagliari).

L'accrescimento del gametofito tetranucleato non è molto accentuato; si vede invece un notevole allargamento di tutto il gametofito (Fig. 8).

Alla V divisione (III gametogenica) i nuclei si dividono formando un gametofito ottonucleato in cui si distinguono nettamente due gruppi di quattro

nuclei ciascuno: il gruppo micropilare che darà origine all'oangio, e il gruppo calazale, che darà origine alle antipodi. Tra i due gruppi di quattro nuclei esiste un immenso vacuolo che abbraccia più di un terzo di tutto il gametofito. Anche nella estrema parte calazale si nota un grande vacuolo (Fig. 8).

Appena si sono formati gli otto nuclei e i fusi non sono ancora riassorbiti, si nota la formazione dei fragmoplasti che daranno origine alle membrane divisorie del territorio citoplasmatico dell'ottonucleato, che verrà così a formare sette cellule, di cui quella centrale, comprendente l'immenso vacuolo, è una cellula binucleata, ed è quella che darà origine alla cellula proendospermatica (Figg. 8 e 9).

Appena vengono riassorbiti i fusi si delimitano chiaramente i territori cellulari dei due gruppi, e precisamente: nella parte micropilare le due sinergidi e la cellula uovo; nella parte calazale le tre antipodi (Fig. 10) in mezzo, come si è detto, la grande cellula comprendente un immenso vacuolo e i due nuclei polari: rispettivamente il nucleo polare superiore del gruppo micropilare e il nucleo polare inferiore del gruppo calazale (Fig. 12).

Un gruppo antipodale è rappresentato nella Fig. 13.

I due nuclei della cellula proendospermatica si muovono per fondersi in un nucleo solo e dare origine alla cellula proendospermatica vera e propria, definendo quindi nettamente la parte dell'oangio da quella delle antipodi.

Singolare e veramente caratteristico è lo sviluppo ulteriore delle antipodi, cellule destinate alla degenerazione, le quali tuttavia mostrano una attività mitotica molto accentuata. Non ho osservato mai alcun caso di poliantipodia nel senso classico della parola; contuttociò i nuclei si dividono, pur restando i territori citoplasmatici sempre in numero di tre (tre cellule antipodali). Ho osservato numerosi casi di cui il più bell'esempio è dato dalla Fig. 11, in cui le tre cellule

Fig. 2. — Cellula madre delle megaspore di *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori (×550 ca.).

Fig. 3. — Cellula madre delle megaspore in divisione eterotipica (×550 ca.).

Fig. 4. — Tetrade di megaspore (×550 ca.).

Fig. 5. — Tetrade di megaspore con le tre megaspore micropilari in degenerazione e la megaspore più calazale con ampia vacuolizzazione (× 550 ca.).

Fig. 6. — Gametofito binucleato, in cui un nucleo, il più calazale è coperto in parte dalle megaspore in degenerazione (×550 ca.).

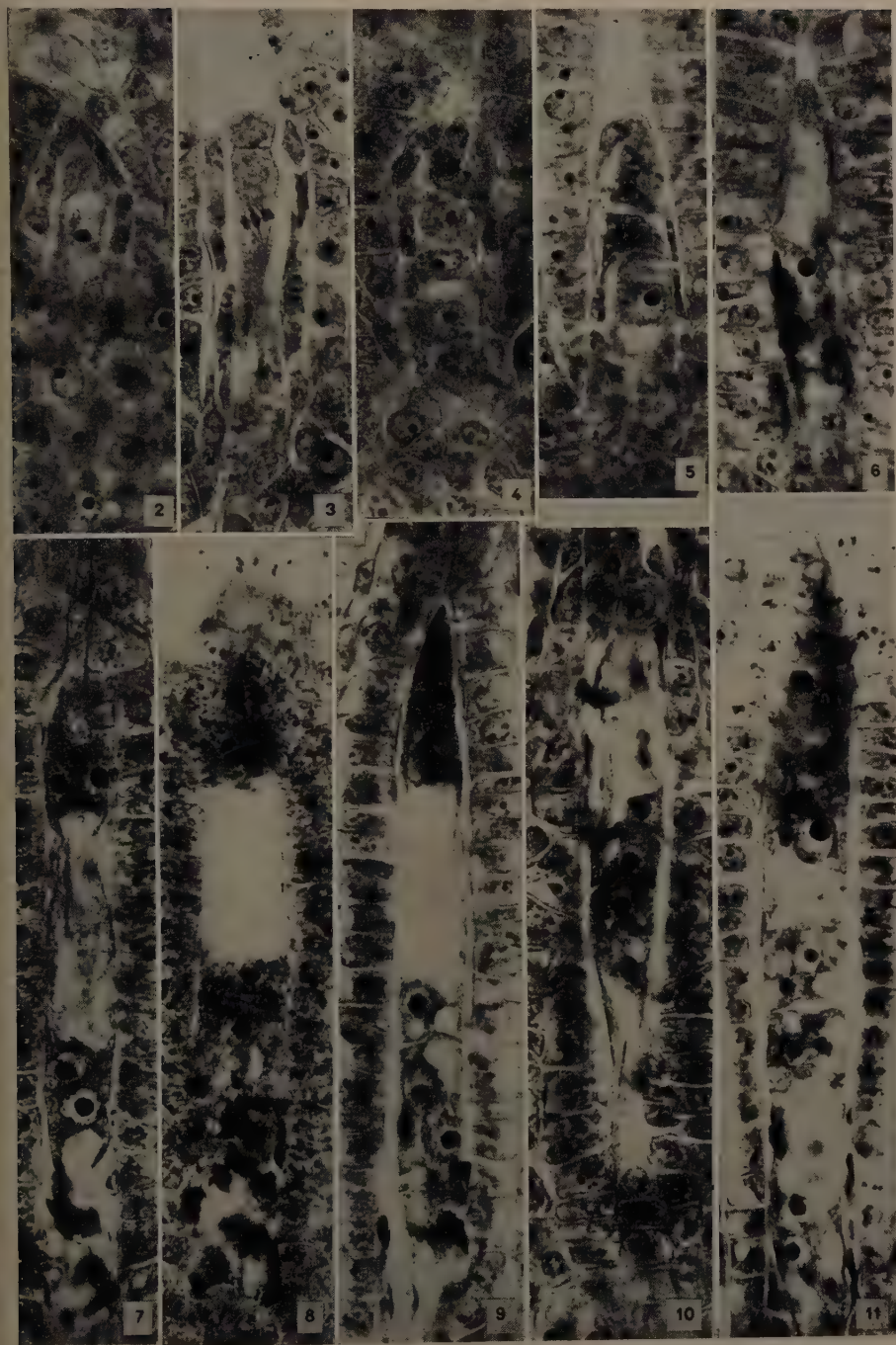
Fig. 7. — Gametofito tetranucleato appena formato (×550 ca.).

Fig. 8. — Gametofito ottonucleato con i fusi della V divisione (III divisione gametogenica) di sviluppo (×550 ca.).

Fig. 9. — Gametofito maturo. Si può osservare il grande spazio occupato dalle cellule antipodali e dal grande vacuolo centrale (×550 ca.).

Fig. 10. — Parte calazale di un gametofito maturo in cui si notano le tre cellule antipodali mononucleate ed il nucleo polare inferiore ancora in posizione calazale (×550 ca.).

Fig. 11. — Gametofito maturo con i due nuclei polari accollati e con le cellule antipodali che hanno diviso ciascuna il proprio nucleo formando un apocizio binucleato.



antipodali occupano più della metà del gametofito, nella porzione calazale e la cellula antipodale più calazale da sola occupa un terzo di tutto il gametofito nel senso della lunghezza. I nuclei delle tre cellule antipodali subiscono contemporaneamente una divisione, senza che a questa segua la divisione del territorio citoplasmatico. Pertanto le tre cellule antipodali diventano tre apocizi binucleati che comprendono un vasto territorio e ampi vacuoli (Fig. 12).

Il gametofito del *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori è quindi del tipo normale ottonucleato, con le antipodi che hanno tendenze nettamente apociziali: non aumenta cioè il numero delle antipodi, che restano sempre fisso al numero di tre, ma i nuclei mostrano una notevole attività mitotica, formando degli apocizi bi- o tetranucleati.

Ho potuto seguire con una fortunata sequela di casi lo sviluppo ulteriore dei nuclei delle antipodi che nel gametofito di *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* mostra una sorprendente regolarità anche se con questa non si riesce a spiegare il meccanismo dell'attività mitotica dei nuclei degli apocizi calazali (tre antipodi apociziali).

Appena si forma il gametofito maturo, cioè appena si delimitano le cellule del gametofito ottonucleato, i nuclei delle tre antipodi subiscono una regolare divisione (Fig. 11) per cui le tre cellule calazali diventano tre apocizi binucleati ampiamente vacuolizzati, cioè alla divisione dei nuclei non segue mai la divisione del territorio citoplasmatico. È vero che i due nuclei delle tre cellule antipodali raramente si allontanano l'uno dall'altro nella stessa cellula.

A questa divisione segue una seconda che interessa tutti i nuclei ma può anche dar luogo a fusioni parziali mostrandosi già in questa fase i nuclei parzialmente fusi (Fig. 13).

Appena la seconda divisione è intervenuta come si può notare almeno nelle

Fig. 12. — Gametofito maturo di *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori con i nuclei delle tre cellule antipodali indivisi. Da notare che il nucleo secondario è già formato ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$).

Fig. 13. — Parte calazale di un gametofito maturo in cui si vede che i nuclei delle tre cellule antipodali hanno subito una divisione e sono in profase della seconda divisione ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$).

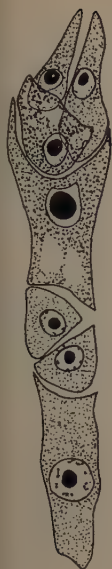
Fig. 14. — Parte calazale e media di un gametofito maturo. I nuclei delle antipodi hanno subito presumibilmente due divisioni (chiaramente si vede nell'antipode più calazale) sebbene i nuclei di due antipodi presentano fenomeni di fusione ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$ ca.).

Fig. 15. — Gametofito maturo con la parte antipodale molto sviluppata. Le tre cellule antipodali mostrano dei nuclei che hanno subito tre divisioni e parziali fusioni nucleari ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$).

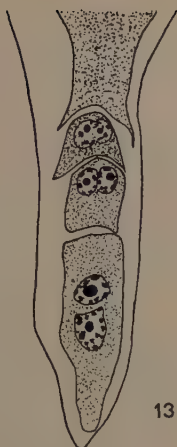
Fig. 16. — Parte antipodale di un gametofito maturo con tre antipodi che mostrano i nuclei polivalenti in tarda profase. Non si scorgono i fusi ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$).

Fig. 17. — Gametofito maturo con lo zigoto e la parte antipodale molto vistosa formata da tre antipodi con nuclei polivalenti (sincari) ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$).

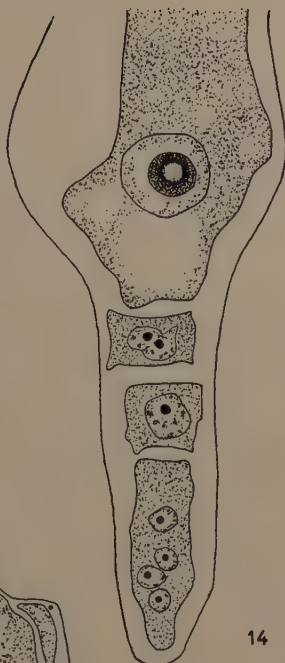
Fig. 18. — Parte calazale di una nucella invasa dall'albume e con l'embrione non visibile, in fase di maturazione ($\times 1100$ ca., rid. $\frac{1}{3}$).



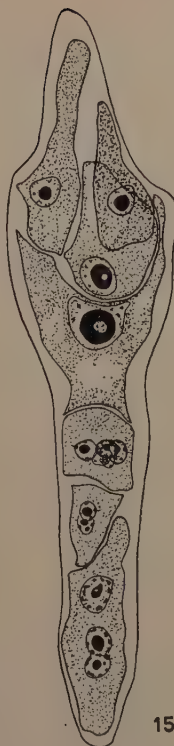
12



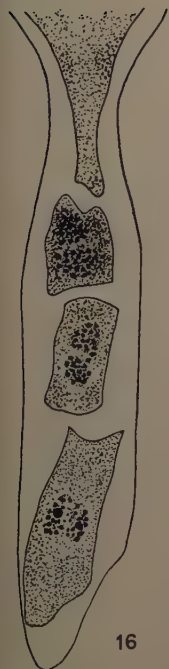
13



14



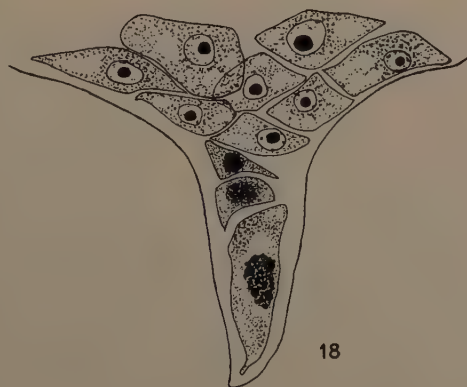
15



16



17



18

cellule calazali della Fig. 14 si formano i nuclei che hanno l'aspetto di nuclei aploidi e quindi normali. Per quello che riguarda le antipodi meno calazali vale il disegno della Fig. 15.

Come si vede comincia in questa fase un ritardo di qualche parte; alle volte il ritardo interessa le antipodi più piccole (Fig. 14), alle volte sono interessati i nuclei delle cellule più calazali (Fig. 15). I nuclei polivalenti che si formano possono avere origine da fusioni che permettono la formazione di sincari i cui nuclei subiscono delle parziali divisioni per endomitosi o parziali divisioni che mostrano i cromosomi in tarda profase (Fig. 16), senza superare la metafase in quanto non si scorgono dei fusi nelle cellule antipodali quando la maturazione della oosfera è già avvenuta (Fig. 17).

Ho potuto seguire la involuzione dei nuclei delle tre antipodali fino alla completa maturazione dello zigote e prime fasi dell'embriogenesi. Quando la nucella è completamente invasa dalle cellule dell'albumine nella zona calazale, in un alloggiamento particolare, si possono scorgere nettamente i tre apociziali calazali che presentano sempre una netta divisione territoriale ed i nuclei polivalenti in degenerazione essendo altamente colorabili (Fig. 18).

Lo schema dello sviluppo (o meglio involuzione) delle antipodi che ho potuto seguire non è molto noto nella letteratura embriologica. Si sa che generalmente le cellule antipodali non seguono uno schema rigido in quanto è noto che le cellule antipodali possono essere in numero di due, tre, sei e alti numeri di cellule e che i nuclei possono essere semplici (apparentemente semplici) o polivalenti.

Tuttavia ci sono dei casi esaminati da vari autori nei quali lo sviluppo delle antipodi può essere schematizzato.

HARLING (1951) ha notato che alcune specie hanno la tendenza ad avere due o tre antipodi apociziali. Questo aspetto si osserva con particolare frequenza nelle specie dei generi *Chrysanthemum* (*C. myconis*, *C. Balsanita*, *C. maximum*), *Matricaria* (*M. matricarioides*) e *Cotula* (*C. turbinata*).

Precedentemente MARTINOLI (1939) aveva osservato che in *Diotis maritima* e *Bellium bellidioides* le antipodi seguono lo schema di sviluppo delle tre antipodi apociziali o lo schema di numerose antipodi sia con nuclei mono che polivalenti. Ma il caso classico, al quale si può riportare lo schema seguito dalle antipodi di *S. leucanthemifolius* var. *pinnatifidus*, è quello descritto dal MARTINOLI (1942) in *Chrysanthemum coronarium*, schema che venne confermato da HARLING (1951) ed è quello che meglio degli altri casi è documentato nella sequenza degli stadi esaminati per *S. leucanthemifolius* var. *pinnatifidus*.

In conclusione si può dire che il gametofito femminile di *S. leucanthemifolius* var. *pinnatifidus* è del tipo normale ottonucleato ma che è interessante per lo sviluppo delle antipodi che sono sempre in numero di tre con caratteri nettamente apociziali.

BIBLIOGRAFIA

- AFZELIUS K., 1924. — *Embryologische und Zytologische studien in Senecio und verwandten Gattugen*. Acta Horti Bergiani, **8**: 123-219.
- CARANO E., 1915. — *Sull'embriologia di Senecio vulgaris L.* Rend. Accad. Lincei, Cl. Sci. mat. fis. e nat., Ser. V, **24**: 1244-1248.
- CHIARUGI A., 1927. — *Ricerche sulla embriologia delle Asteraceae*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **34**: 717-777.
- DARLINGTON C. D. and WILIE A. P., 1955. — *Chromosome atlas of flowering plants*. Allen & Unwin LTD, London.
- HARLING G., 1951. — *Embryological studies in the Compositae: II. Anthemideae-Chrysantheminae*. Acta Horti Bergiani, **16**: 1-56.
- , 1960. — *Further embryological and taxonomical studies in Anthemis L. and some related genera*. Sv. Bot. Tidskr., **54**: 571-590.
- MARTINOLI G., 1939. — *Contributo all'embriologia delle Asteraceae: I-III*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **46**: 259-298.
- , 1942. — *Contributo alla embriologia delle Asteraceae. VI*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **49**: 311-336.
- SCHNARF K., 1929. — *Embryologie der Angiospermen*. Berlin.

SUMMARY

The Author describes the female gametophyte of *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori, a variety which thrives mainly along the western coasts of the Mediterranean sea.

The gametophyte of the mentioned variety appears to be of the regular eight-nucleate type. It shows an interesting development of the antipodal cells which are always three and visibly forming a coenocyte.

The Author could follow the divisions of the nuclei of the antipodal cells which, undergoing complete or partial mitosis, and by fusing in polyploid nuclei. In most cases, though not perfectly, it is possible to follow three nuclear divisions which occur after the one that makes the gametophyte mature.

When the embryo is in the first stages of his own development, and the albumen has completely substituted the nucellar tissue, the three (polyvalent) antipodal cells are still visible in the calazal and, though they have indeed started degenerating.

RIASSUNTO

L'Autore descrive lo sviluppo del gametofito femminile di *Senecio leucanthemifolius* Poir. var. *pinnatifidus* Fiori, varietà che è diffusa prevalentemente lungo le coste del Mediterraneo occidentale.

Il gametofito della varietà studiata risulta essere del tipo normale ottonucleato, il quale presenta un interessante sviluppo delle antipodi che sono sempre in numero di tre, ma con caratteri nettamente apociziali.

L'A. ha potuto seguire la divisione che interessa i nuclei delle tre antipodi, i quali subendo mitosi complete o parziali ritornano a fondersi in nuclei poliploidi. Generalmente si può seguire in modo non perfetto tre successive divisioni dei nuclei che seguono alle divisioni che hanno dato origine al gametofito maturo.

Anche quando l'embrione è ai primi stadi di sviluppo e l'albumen ha invaso tutto il territorio della nucella le tre antipodi polivalenti si trovano nella parte calazale nettamente distinte sebbene in via di degenerazione.



CYTOLOGICAL STUDIES IN *HELIOTROPIMUM* FROM WEST PAKISTAN

SHAMIM A. FARUQI

Department of Botany and Plant Pathology, Oklahoma State University,
Stillwater, Oklahoma, U.S.A.

Received: 25th April 1961

INTRODUCTION

Of the 220 species recognized by GURKE (1891) as belonging to the genus *Heliotropium*, only 11 are known cytologically. Thirteen species are present in the West Pakistan, 11 of which are strictly confined to the Old World. Two, *H. indicum* L. and *H. curassavicum* L., are cosmopolitan in their distribution and belong the New World group (JOHNSTON 1928). Only 6 of these 11 Old World species are known cytologically. Previous studies have revealed interesting cytological features such as aneuploidy, polyploidy and chromosomal races (BRITTON 1951, AHUJA 1955, AHUJA *et al.* 1957, and MALIK *et al.* 1959). Extensive cytological studies in a particular region may thus indicate trends of polyploid adaptations, as well as provide data that could be used taxonomically.

MATERIAL AND METHODS

Seven species were collected from Karachi, West Pakistan. At least ten populations of each species were studied. Depending upon distribution, plants were collected from 4 different localities: Manghopir, Nazimabad, Drighroad and Malir. Inflorescences were fixed in Carnoy's fluid and the chromosomes stained in acetocarmine. Herbarium specimens are deposited in the Gray Herbarium, Harvard University.

OBSERVATIONS

The chromosome numbers of *Heliotropium ophioglossum* and *H. subulatum* were found to be $n = 14$ (Fig. 2), while in *H. undulatum*, *H. tuberculosum*, *H. lignosum* and *H. strigosum* the basic number is $n = 16$ (Fig. 3). This is in agreement with previous reports for *H. undulatum* and *H. strigosum* by MALIK *et al.* (1959) from Bharat.

Heliotropium ophioglossum is characterized by numerous univalents (Fig. 1) correlated with cytoplasmic irregularities (FARUQI 1961). Laggards and bridges were observed in *H. lignosum* (Fig. 5) while bot univalents and multivalents

are common in *H. rariflorum* (Fig. 6). Other species are more or less regular (Fig. 4) in respect of chromosomal behavior during microsporocyte development.

DISCUSSION

HAGERUP (1932) indicates tolerance of polyploids to extreme ecological conditions, annual diploid *Eragrostis* being confined to lake margins, while the

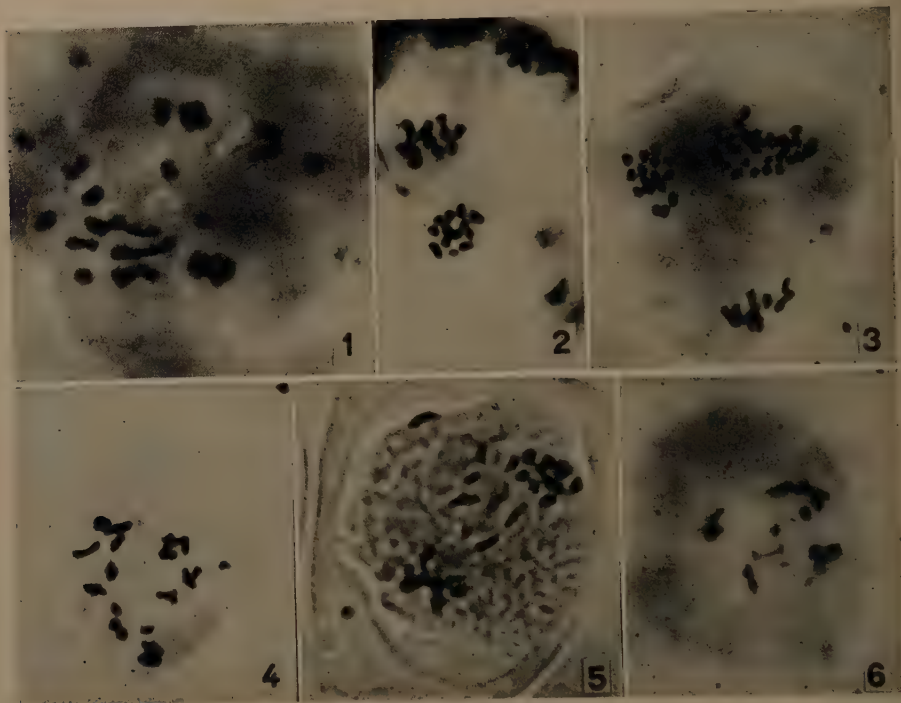


Fig. 1. — Meiotic metaphase in *Holotritium ophioglossum* showing univalents; $\times 1350$.
 Fig. 2. — Meiotic anaphase in *H. ophioglossum* showing $n = 16$ chromosomes; $\times 1350$.
 Fig. 3. — Meiotic anaphase in *H. undulatum* showing $n = 16$ chromosomes; $\times 1350$.
 Fig. 4. — Meiotic metaphase in *H. undulatum* showing a regular chromosomal behavior; $\times 1350$.

Fig. 5. — Laggards and bridges in meiotic anaphase of *H. lignosum*; $\times 1350$.

Fig. 6. — Multivalent formation in meiotic metaphase of *H. rariflorum*; $\times 1350$.

tetraploid is perennial and grows in dry habitats, and the octoploid is a very robust perennial and grows in dry habitats, and the octoploid is a very robust perennial present on sand dunes. SHIMOTOMAI (1933) points out that polyploidy is common along sea coasts. CLAUSEN *et al.* (1945) show that in *Artemisia* diploids are more

coastal in their distribution. TISCHLER (1937) found polyploidy associated with saline conditions in Northern Europe. TARNAVSCHI (1939), in Romania, found tetraploids to be inland and diploid confined mostly to salt marshes. STEBBINS (1950) points out that most of these studies are based on floras rather than smaller taxonomic groups. It is evident that any hard and fast rule cannot be laid down for the distribution and ecological tolerance of polyploids. Intensive studies on the origin of polyploids indicate hybridization as the basic source of chromosome doubling (WINGE 1917, CLAUSEN *et al.* 1925, MUNTZING 1930). It has also been observed that polyploids are more adaptable to extreme habitats than their diploid relatives. This could be attributed to their hybrid origin.

In the Old World representatives of *Heliotropium*, the lowest chromosome number recorded is $n = 8$, in *H. supinum* a herb associated with rice fields and

TABLE I

Name of Plant	Chromosome number	Authority	Ecology	Geographic distribution
<i>H. undulatum</i> Vahl	$n=16$	MALIK <i>et al.</i> 1959 FARUQI	Dry roadside	Africa and Middle East Asia
<i>H. tuberculosum</i> Boiss.	$n=16$	FARUQI	Limestones, saline soil and sand dunes	Persia and W. Pakistan
<i>H. lignosum</i> Vatke	$n=16$	FARUQI	Saline soil	Africa and Middle East Asia
<i>H. ophioglossum</i> Stocks ex Aitch.	$n=14$	FARUQI	Dry and stony dry	Beluchistan and Trop. Africa
<i>H. subulatum</i> Hochst.	$n=14$	FARUQI	Roadside	Indo-Pakistan and Trop. Africa
<i>H. rariflorum</i> Stocks	$n=24$	FARUQI	Dry and hard gravel	Pakistan, Afghanistan, Nubia, Socotia
<i>H. strigosum</i> Willd.	$n=16$ $n=16$	MALIK <i>et al.</i> 1959 FARUQI	Herb in rainy season	Africa, Asia and Australia
<i>H. eichwaldi</i> Steud.	$n=16$ $n=32$ $n=32$	PAL 1957 AHUJA 1955 MALIK <i>et al.</i> 1959	Ruderal or near farmlands	Bharat, W. Pakistan, Central Asia, and Australia
<i>H. ovalifolium</i> Forsk.	$n=16$	PAL 1957	Seasonal weed in rain	Trop. Africa, Indo-Pakistan, Burma and Australia
<i>H. supinum</i> Linn.	$n=8$	BRITTON 1951	Wet places	S. Europe, S.W. Asia, and N. Africa
<i>H. europeum</i> Aitch.	$n=12$ $n=16$	SVENSSON 1925 BRITTON 1951	Weed in grassland	Europe, S.E. Asia, Africa and Australia

extending to West Pakistan. As pointed out by BRITTON (1951), if we treat this species as diploid for the Old World *Heliotropium* group, we find an aneuploid series superimposed on polyploidy, giving rise to plants with $n = 12, 14, 16, 24,$ and 32 . These plants occupy different ecological conditions than the diploid, extending to apparently more recent habitats such as saline soils, and dunes, limestone hills, and as ruderal plants (Table I). From the geologic history of this area it is obvious that these extreme conditions did not prevail in the recent past. As the newer ecological conditions seem to be more severe than the pre-existing ones, the newly evolved polyploids got adjusted to these conditions. Thus, it exhibits essentially the same type of features as found by HAGERUP (1932) in *Eragrostis*.

Presence of univalents, multivalents and bridges are indicative of hybridization and chromosomal rearrangements. The presence of multivalents in *H. rariflorum* suggests that this species is an autotetraploid. Presence of up to 6 univalents in certain cells indicates that a number of chromosomes often fail to pair, suggesting some degree of chromosomal homeology rather than homology, which may not be indicative of an autotetraploid. It may thus be possible that *H. rariflorum* originated from hybridization between two closely related species or races with some degree of chromosome similarity, but not complete homology. It could thus be regarded as a segmental allopolyploid. This plant could either have evolved from a cross between two species or races with $n = 12$ or one with $n = 8$ and the other with $n = 16$ chromosomes. From morphological data, the closest relatives have $n = 16$ chromosomes. The available cytological data also favors this hypothesis. Conclusive evidence could only be obtained after additional experimental studies.

The three species with $n = 16$ chromosomes, *H. lignosum*, *H. tuberosum*, and *H. undulatum* are closely related morphologically and their status as distinct species is debatable. Cytological observations indicate that the chromosomes of *H. undulatum* are smaller than those of the other two species. The smaller chromosome size seems to be distinct and more advanced.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is highly indebted to Professor REED C. ROLLINS, Director, Gray Herbarium of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, for providing laboratory facilities and to Dr. J. M. J. DE WET of Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, for helpful suggestions in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- AHUJA M. R., 1955. — *Chromosome numbers of some plants*. Ind. Jour. Gen. and Pl. Br., **15**: 142-143.
 AHUJA M. R. and NATARAJAN A. T., 1957. — *Chromosome number of some common plants*. Curr. Sci., **26**: 117.

- BRITTON D. M., 1951. — *Cytogenetic studies on the Boraginaceae*. Brittonia, **7**: 233-266.
- CLAUSEN J., KECK D. D. and HIESEY W. M., 1945. — *Experimental studies on the nature of species. II. Plant evolution through amphiploidy and autopolyploidy, with examples from the Madiinae*. Carnegie Inst. Washington, **564**: 1-174.
- CLAUSEN R. E. and GOODSPEED T. H., 1925. — *Interspecific hybridization in Nicotiana. II. A tetraploid glutinosa - Tabacum hybrid an experimental verification of Winge's hypothesis*. Genetics, **10**: 278-284.
- FARUQI S. A., 1961. — *Abnormal meiosis and polyad formation in Heliotropium ophioglossum*. Cytologia (in press).
- HAGERUP VON O., 1932. — *Über Polyploidie in Beziehung zu Klima, Ökologie, und Phylogenie*. Hereditas, **16**: 19-40.
- GURKE M., 1891. — *Boraginaceae*. In: ENGLER und PRANTL. Die natürlichen Pflanzenfamilien, IV (3a): 71-131.
- JOHNSTON I. M., 1928. — *Studies in the Boraginaceae - VII. 1. The South American species of Heliotropium*. Contr. Gray Herb., **81**: 3-73.
- MALIK C. P., SEHGAL S. M. and TANDON S. L., 1959. — *Chromosome number in some species of Heliotropium*. Curr. Sci., **28**: 500.
- MUNTZING A., 1930. — *Über chromosomenvermehrung in Galeopsis-Kreuzungen und ihre phylogenetische Bedeutung*. Hereditas, **14**: 153-172.
- PAL P. K., 1957. — *Chromosome number in the genus Heliotropium* Linn. Curr. Sci., **26**: 218.
- SHIMOTOMAI N., 1933. — *Zur Karyogenetik der Gattung Chrysanthemum*. Jour. Sci. Hiroshima Univ., **2**: 1-100.
- STEBBINS G. L. Jr., 1950. — *Variation and Evolution in Plants*. Columbia Univ. Press, N.Y., 546.
- SVENSSON H. G., 1925. — Uppsala Univ. Arsskr. No. 2. In: C. D. DARLINGTON and A. P. WYLIE's, *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. Allen & Unwin Ltd., London 1955.
- TARNAVSCHI T., 1939. — *Karyologische Untersuchungen an Halophyten aus Rumänien im Lichte zyto-ökologischer und zyto-geographischer Forschung*. Bull. Fac. Stiinte din Cernauti, **12**: 68-106.
- TISCHLER G., 1937. — *Die Halligen flora der Nordsee im Lichte cytologischer Forschung*. Cytologia, Fujii Jubil., 162-169.
- WINGE O., 1917. — *The chromosomes. Their numbers and general importance*. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, **13**: 131-275.

SUMMARY

1. - Seven species of *Heliotropium* from Karachi, West Pakistan, were studied cytologically to find out the possible trends of polyploid adaptation, as well as to provide data that could be used taxonomically.

2. - Including previous cytological information, the genus showed a considerable variation in chromosome numbers. The haploid chromosome numbers were found to be $n=8$, 12, 14, 16, 24 and 32. These aneuploids and polyploids occupy a different ecological condition than the diploid, extending apparently, to more recent habitats which are more severe.

3. - Presence of multivalents as well as univalents in *H. variflorum* with $n = 24$ chromosomes indicates it to be a segmental allopolyploid.

4. - The three morphologically similar species *H. lignosum*, *H. tuberosum* and *H. undulatum*, possess a similar chromosome number of $n = 16$. However, *H. undulatum* chromosomes differ in being smaller than the other two species.

RIASSUNTO

1. - Sono state studiate dal punto di vista citologico sette specie di *Heliotropium* provenienti da Karachi, nel Pakistan Occidentale, allo scopo di individuare le possibili tappe di adattamento alla poliploidia, e altresì per fornire dei dati che possano essere usati nella tassonomia.

2. - Tenendo conto anche dei dati di precedenti ricerche, risulta che il genere *Heliotropium* presenta una variazione considerevole nei numeri cromosomici. I numeri cromosomici aploidi sono $n = 8, 12, 14, 16, 24$ e 32 . Questi aneuploidi e poliploidi presentano una condizione ecologica diversa dai diploidi, estendendosi come sembra ad habitat più recenti, con condizioni di vita più difficili.

3. - La presenza di multivalenti e di univalenti in *H. rariflorum*, con $2n = 24$, dimostra che esso è un allopoliploide segmentale.

4. - Le tre specie morfologicamente simili *H. lignosum*, *H. tuberosum* e *H. undulatum* possiedono lo stesso numero cromosomico $n = 16$. Tuttavia i cromosomi di *H. undulatum* differiscono per essere più piccoli di quelli delle altre due specie.

LO SVILUPPO DEL GAMETOFITO FEMMINILE DI *HYPOCHAERIS AETNENSIS* L.

ROSALIA BERUTI

Istituto di Botanica dell'Università, Pisa

In Redazione: il 15 Marzo 1961

INTRODUZIONE

L'*Hypochaeris aetnensis* L. (*Asteraceae*, sez. *Seriola*) è una specie che si trova frequentemente, dal febbraio al luglio, su tutte le coste della regione mediterranea, nei luoghi aridi, sassosi, con scarso terriccio e in associazione con poche specie, per lo più annuali.

Sono note per il territorio italiano due varietà: la var. *typica* (Fiori) nella penisola dal Nizzardo al Faentino fino al sud e nelle isole; la var. *foliosa* (Arc.), mescolata alla *typica* in Liguria, Toscana (Porto S. Stefano), Marche, Calabria (Bagnare), Corsica (Pietranera), Elba (Portoferraio), Isola del Giglio, etc.

MATERIALE E TECNICA

Il materiale che ha servito per lo studio dell'embriologia dell'*Hypochaeris aetnensis* L. è stato raccolto alla base del Monte Moriglion di Penna e sul Monte S. Giuliano nei Monti Pisani, su terra rossa derivante dal disfacimento della roccia calcarea.

I capolini, fissati in Karpetchenko e inclusi in paraffina usando alcool butilico normale e terziario, sono stati sezionati in serie complete dello spessore di 12-18 μ . La colorazione è stata eseguita con ematossilina ferrica, secondo il metodo di Heidenhein.

RISULTATI

Il gametofito femminile di questa specie è del tipo normale otto-nucleato.

L'ovulo è anatropo, come di regola nelle *Asteraceae*: tuttavia, nei primissimi stadi di sviluppo, ha una posizione ortotropa che viene modificata nell'ulteriore sviluppo.

L'archisporio è tenuinocellato, come in genere in tutte le *Compositae*, poiché un solo strato di cellule lo separa dal canale micropilare. Una sola cellula archisporiale si comporta da gonotoconte.

[*Caryologia*, Vol. 14, n. 2, 1961

Le cellule madri (Fig. 1) sono generalmente molto grandi e ben visibili. Pure avendo notato delle divisioni eterotipiche della cellula madre, non mi è stato possibile determinare con esattezza il numero cromosomico (Fig. 2).

Le divisioni della cellula madre sono del tutto normali e portano alla formazione di quattro megaspore (Fig. 3). Delle quattro megaspore quella più interna della nocella è quella che darà origine al gametofito. La megaspore più calazale infatti appare alla fine del processo di accrescimento ingrandita e vacuolizzata, mentre le tre megaspore micropilari appaiono degenerate, e di esse rimane solo una traccia come residuo fortemente colorabile (Fig. 4).

Alla vacuolizzazione segue il processo della somatogenesi che si manifesta con una divisione nucleare (III divisione) con la conseguente formazione di un gametofito binucleato i cui due nuclei si allontanano portandosi ai due poli opposti micropilare e calazale. Esso mostra un enorme vacuolo verso la calaza, mentre al micropilo la vacuolizzazione è piuttosto ridotta. Al centro un grande vacuolo separa i due nuclei del binucleato (Fig. 5).

Si nota intanto un accrescimento del gametofito fino a raggiungere quasi il doppio delle dimensioni del mononucleato. A questo punto avviene la quarta divisione nucleare (II gametogenica) con la formazione del gametofito tetranucleato (Fig. 6).

Oltre all'allargamento del gametofito tetranucleato rispetto al binucleato si nota pure un notevole allungamento.

Alla V divisione (III gametogenica) i quattro nuclei si dividono. In un preparato ho trovato tutti e quattro i nuclei contemporaneamente in anafase e ho potuto constatare come all'estremità micropilare uno dei fusi, e precisamente quello che darà origine alle sinergidi, sia orientato trasversalmente, mentre l'altro che darà origine all'uovo e al nucleo polare superiore sia orientato longitudinalmente (Fig. 9).

In questo stadio ho potuto anche determinare il numero cromosomico, naturalmente aploide $n = 6$, avendo conferma quindi del $2n = 12$ secondo i dati presi da DARLINGTON e WYLIE (1955).

Si viene a formare così un gametofito otto-nucleato, in cui si nota subito

Fig. 1. — Nocella con cellula madre in sinapsi. $\times 1500$ ca.

Fig. 2. — Nocella con cellula madre in anafase della divisione eterotipica. $\times 1500$ ca.

Fig. 3. — Tetrade di megaspore: le due megaspore calazali appaiono più sviluppate, ma solo la più calazale prosegue nello sviluppo; l'altra è destinata a degenerare. $\times 1500$ ca.

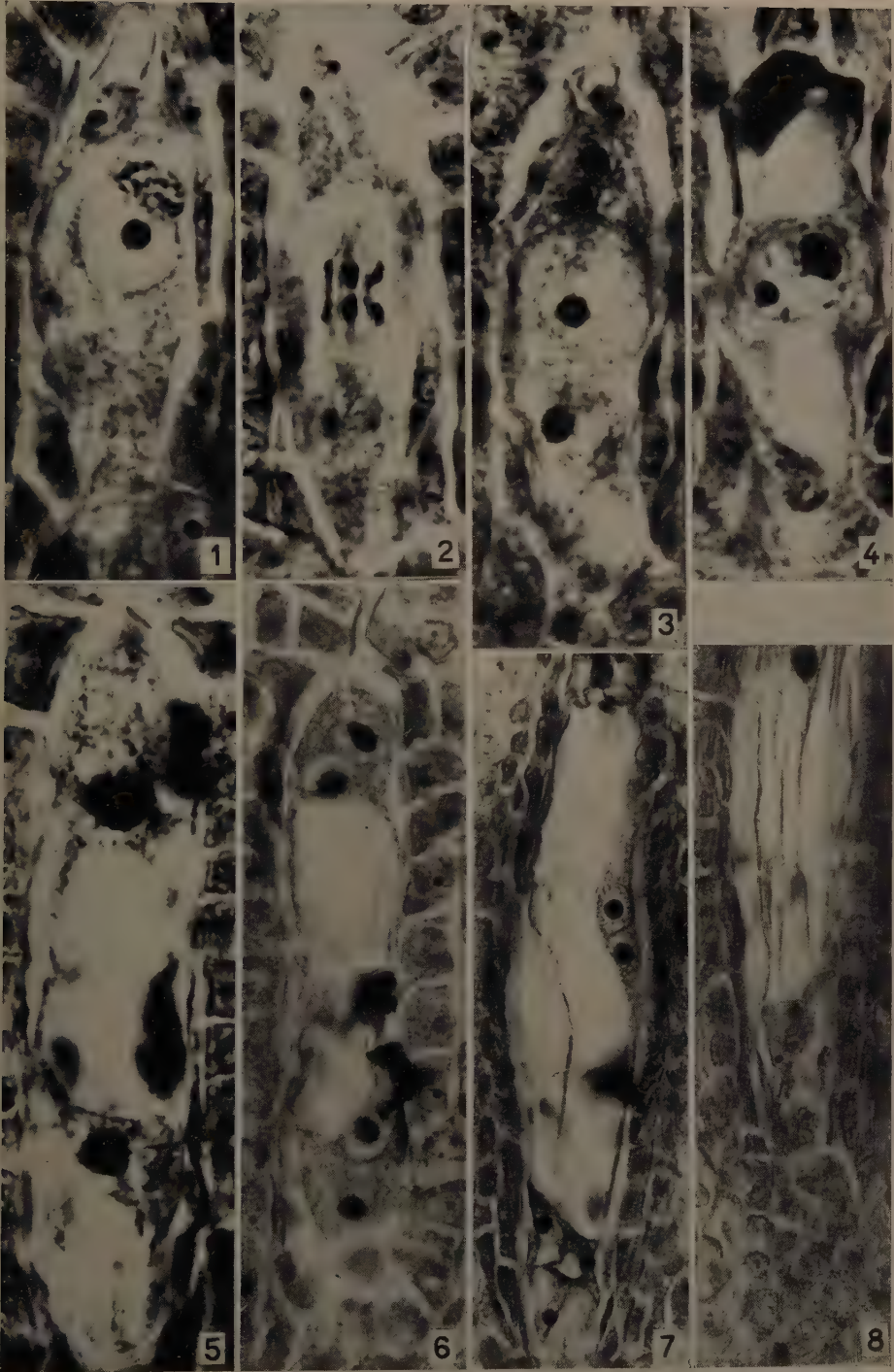
Fig. 4. — Gametofito mononucleato in profase della prima divisione gametogenica. $\times 1500$ ca.

Fig. 5. — Gametofito binucleato al termine della polarizzazione con ampia cavità vacuolare. $\times 1500$ ca.

Fig. 6. — Gametofito tetranucleato appena formato. $\times 500$ ca.

Fig. 7. — Gametofito otto-nucleato mancante della parte micropilare. $\times 500$ ca.

Fig. 8. — Apparato antipodale del gametofito adulto in cui si contano 6 antipodi. $\times 500$ ca.



l'inizio della divisione dei territori citoplasmatici, divisione che porterà alla formazione del gametofito maturo; si costituisce così l'oangio fertile, cioè l'apparato ovarico (2 sinergidi e l'uovo) e il nucleo polare superiore, e l'apparato antipodale (3 cellule antipodali) più il nucleo polare inferiore (Fig. 7, parzialmente).

La disposizione delle cellule del gametofito è normale, cioè si nota nella parte micropilare la cellula uovo situata inferiormente alle due sinergidi; nella parte calazale le tre antipodi, in mezzo una grande cellula comprendente un immenso vacuolo e i due nuclei polari, rispettivamente il nucleo polare superiore del gruppo micropilare, e il nucleo polare inferiore del gruppo calazale.

I due nuclei di questa cellula in seguito si uniscono e si fondono in un solo nucleo per dare origine alla cellula proendospermatica vera e propria, definendo e quindi staccando nettamente la parte dell'oangio da quella delle antipodi.

Singolare e caratteristico è lo sviluppo ulteriore delle cellule antipodali, che sono destinate alla completa degenerazione dopo una serie di divisioni.

Nel gametofito femminile di *Hypochaeris aetnensis* ho potuto seguire con una palese regolarità il susseguirsi delle divisioni che interessano le cellule antipodali dopo la maturazione del gametofito. Infatti ciascuna cellula antipodale subisce una prima divisione (Figg. 8, 10 e 11) che interessa i nuclei ed i territori citoplasmatici rispettivi, con formazione di sei antipodi mononucleate e aventi valore aploide.

A questa divisione segue un'altra che interessa tanto i nuclei quanto i territori citoplasmatici fornendo nella parte calazale dodici antipodi mononucleate (Fig. 12); ma già a questo stadio si notano delle differenze di grandezza delle cellule e dei nuclei tanto che riesce difficile asserire che i nuclei abbiano lo stesso valore.

Nell'esame dei preparati ho osservato che il numero delle cellule antipodali aumenta, ma dopo la terza divisione si nota che alcune cellule possiedono due nuclei e che il numero delle stesse non è regolare in quanto non ho mai osservato 24 cellule antipodali fornite di un solo nucleo.

La fortunata sequela delle divisioni che interessano le cellule antipodali pone il gametofito femminile di *Hypochaeris aetnensis* tra quelle specie che presentano in modo accentuato il fenomeno della poliantipodia, i cui casi sono oramai noti nella letteratura, sebbene pochi siano quelli che con tanta regolarità ripetono lo schema del gametofito di questa specie.

Precedentemente il fenomeno è stato osservato da MARTINOLI (1939, 1940) in *Diotis maritima* Desf., *Bellium bellidioides* L., *Bellium crassifolium* Moris e da HARLING (1951a e 1951b), più recentemente in *Chrysanthemum viscidohirtum* (Scholl) Thell., *Haplopappus Lyallii* A. Gr., *Langenophora Erics* Forbes, *Myriactis nepalensis* Less., *Brachycome iberidifolia* Benth., *Erygeron frigidus* Boiss., *E. patentisquamus* Jeffr., *E. bonariensis* L. e *Conyza macrophylla* Spreng.



Fig. 9. — Tetranucleato che mostra i nuclei in anafase. Si osserva il numero dei cromosomi $n=6$. $\times 1500$ ca.

Fig. 10. — Gametofito otto-nucleato con 6 antipodi. $\times 1500$ ca.

Fig. 11. — Apparato antipodale con 6 antipodi. $\times 2300$ ca.

Fig. 12. — Apparato antipodale con 12 antipodi. $\times 2300$ ca.

A questo proposito HARLING (1951b pagg. 105-106) commentando i vari casi di poliantipodia, cioè i casi analoghi a quello dell'*H. aetnensis*, si esprime nel seguente modo: « The antipodes are primarily three, I-nucleate. Through secondary divisions there arises an antipode complex consisting usually of 6-9 cells, although occasionally of as many as 12. The antipodes are often multinucleate ». Perciò è necessario concludere che il caso delle poliantipodi di *Hypochaeris aetnensis* è il più chiaro dei casi precedentemente studiati per la regolarità che si riscontra nelle divisioni (I e II) del gruppo delle cellule antipodali. Soltanto alla terza divisione si notano dei fenomeni di involuzione che portano in seguito alla degenerazione del complesso cellulare delle antipodi.

Il gametofito di *H. aetnensis* quindi fa parte, per quello che riguarda lo sviluppo delle cellule antipodali, del gruppo di quelle specie che mostrano un'accentuata poliantipodia e si distacca da quel gruppo di specie che presentano — come nelle *Anthemideae* e nel genere *Senecio* — sempre e soltanto tre cellule antipodali con nuclei polivalenti, come risulta dalla ampia letteratura.

BIBLIOGRAFIA

- AFZELIUS K., 1924. — *Embriologische und Zytologische studien in Senecio und verwandten Gattungen*. Acta Horti Bergiani, **8**: 123-219.
- CARANO E., 1915. — *Sull'embriologia di Senecio vulgaris L.* Rend. Accad. Lincei, Cl. Sci. Fis. e Nat., Ser. V, **24**: 1244-1248.
- CHIARUGI A., 1927a. — *Il gametofito femminile delle Angiosperme nei suoi vari tipi di costruzione e di sviluppo*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **34**: 7-133.
- , 1927b. — *Ricerche sulla embriologia delle Asteraceae*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **34**: 717-777.
- DARLINGTON C. D. and WILIE A. P., 1955. — *Chromosome atlas of flowering plants*. Allen & Unwin LTD, London.
- HARLING G., 1950. — *Embryological studies in the Compositae: I. Anthemideae-Anthemidinae*. Acta Horti Bergiani, **15**: 135-168.
- , 1951a. — *Embryological studies in the Compositae: II. Anthemideae-Chrysantheminae*. Acta Horti Bergiani, **16**: 1-56.
- , 1951b. — *Embryological studies in the Compositae: III. Astereae*. Acta Horti Bergiani, **16**: 73-120.
- , 1960. — *Further embryological and taxonomical studies in Anthemis L. and some related genera*. Sv. Bot. Tidskr., **54**: 571-590.
- JOHANSEN D. A., 1950. — *Plant Embryology*. Chronica Botanica Comp., U.S.A.
- MAHESHWARI P., 1950. — *An introduction to the embryology of Angiosperms*. Mc. Graw-Hill Book Company Inc., New York.
- MARTINOLI G., 1939. — *Contributo all'embriologia delle Asteraceae: I-III*. Nuovo Giorn. Bot. It., n.s., **46**: 259-298.
- , 1940. — *Contributo alla embriologia delle Asteraceae: IV-V*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **47**: 287-322.
- , 1942. — *Contributo alla embriologia delle Asteraceae. VI*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **49**: 311-336.
- SCHNARF K., 1929. — *Embryologie der Angiospermen*. Berlin.
- TISCHLER G., 1926. — *Allgemeine Pflanzenkaryologie*. Berlin.

SUMMARY

The Author has examined the female gametophyte of *Hypochaeris aetnensis* L. (*Asteraceae*, sez. *Seriola*) which appears to have eight nuclei and to be of the normal type.

After maturation the three antipodal cells divide in to six aploidal cells. Later a second division follows originating, by the same way, twelve antipodal cells.

Subsequently other divisions occur, but they are rather irregular so that the antipodal cells may show two or three nuclei each, and clear signes of degeneration.

Among the known cases of polyanitpody, which occur expecially within the *Asteraceae* family, this is one of the most typical and regular.

RIASSUNTO

L'Autore studia il gametofito femminile di *Hypochaeris aetnensis* L. (*Asteraceae*, Sez. *Seriola*), che risulta del tipo di sviluppo normale otto-nucleato.

A maturità le tre cellule antipodali si dividono dando sei cellule con i nuclei aploidi. Alla prima divisione segue una seconda con lo stesso meccanismo che eleva a 12 il numero delle antipodi.

Seguono poi altre divisioni in modo alquanto irregolare, per cui le cellule antipodali cominciano a mostrarsi con due o tre nuclei dando segni di evidente degenerazione.

Tra i casi di poliantipodia noti nella letteratura, in particolare tra i gametofiti di alcune *Asteraceae*, questo è uno dei casi più caratteristici e regolari.



NOTIZIE

Il Prof. EMILIO BATTAGLIA è stato nominato titolare della cattedra di Genetica della Facoltà di Scienze dell'Università di Bari.

Il Prof. FELICE BERTOSSI è stato nominato titolare della cattedra di Fisiologia Vegetale della Facoltà di Scienze dell'Università di Bologna.

Il Prof. MARIO BOLLI è stato chiamato alla cattedra di Fisiologia Vegetale della Facoltà di Scienze dell'Università di Perugia.

Il Prof. LUIGI L. CAVALLI-SFORZA è stato nominato titolare della cattedra di Genetica della Facoltà di Scienze di Parma.

Il Prof. RUGGERO CEPPELLINI è stato nominato titolare della cattedra di Genetica Umana della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Torino.

La Prof. ELEONORA CORTI FRANCINI è stata trasferita dalla cattedra di Botanica dell'Università di Bari a quella dell'Università di Firenze.

Il Prof. FRANCESCO D'AMATO è stato trasferito dalla cattedra di Botanica dell'Università di Cagliari a quella di Genetica della Facoltà di Agraria dell'Università di Pisa.

Il Prof. LUIGI DESÒLE è stato nominato titolare della cattedra di Flora ed Erboristeria Sarda della Facoltà di Farmacia dell'Università di Sassari.

Il Prof. GUIDO FRIZZI è stato nominato titolare della cattedra di Genetica della Facoltà di Scienze dell'Università di Cagliari.

Il Prof. LUIGI GEDDA è stato nominato titolare della cattedra di Genetica Umana della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Roma.

Il Prof. FILIPPO MARCABRUNO GEROLA è stato nominato titolare della cattedra di Botanica della Facoltà di Agraria (Piacenza) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Milano.

Il Prof. VALERIO GIACOMINI è stato trasferito dalla cattedra di Botanica dell'Università di Catania a quella dell'Università di Napoli.

Il Prof. VITTORIO MARCHESONI è stato trasferito dalla cattedra di Botanica dell'Università di Camerino a quella di Fisiologia Vegetale della Facoltà di Scienze dell'Università di Padova.

Il Prof. ERASMO MARRÈ è stato nominato titolare della cattedra di Fisiologia Vegetale della Facoltà di Scienze dell'Università di Milano.

Il Dr. FRIEDRICH MECKELKE si è trasferito dall'Institut für Kulturpflanzenforschung di Gatersleben al Max-Plank-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut) di Köln-Vogelsang.

Il Prof. ALDO MEROLA è stato nominato titolare della cattedra di Botanica dell'Università di Messina.

La Prof. ALBINA MESSERI è stata trasferita dalla cattedra di Botanica dell'Università di Messina a quella dell'Università di Bari.

Il Prof. GIUSEPPE MONTALENTI è stato trasferito dalla cattedra di Genetica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli a quella della Facoltà di Scienze dell'Università di Roma.

Il Prof. PIETRO OMODEO è stato nominato titolare della cattedra di Biologia e Zoologia Generale della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Siena.

Il Prof. RUGGERO TOMASELLI è stato nominato titolare della cattedra di Botanica dell'Università di Catania.

Il PREMIO MARZOTTO 1961 per la Medicina è stato assegnato « in forma unitaria al complesso dei lavori compiuti sulle cellule neoplastiche » dal Prof. ARTURO BOLOGNARI dell'Università di Messina e dal Prof. FELICE GAVOSTO dell'Università di Torino. In particolare, il Prof. BOLOGNARI è stato premiato per il lavoro: « Vedute attuali sul nucleolo e sull'ergastoplasma degli ovociti e delle cellule tumorali » edito dalla Società Peloritana di Scienze Naturali e il Prof. GAVOSTO per il lavoro: « Biochimica dei tumori - Acidi nucleici e proteine » edito da Boringhieri.

È stata fondata a Milano la SOCIETÀ ITALIANA DI FISIOLOGIA VEGETALE.

CARYOLOGIA, periodico fondato da **ALBERTO CHIARUGI**, è dedicata alla pubblicazione di ricerche originali di citologia, di citosistemica e di genetica su piante e animali. Ogni volume viene pubblicato annualmente suddiviso in tre fascicoli e comprende circa 400-500 pagine.

MANOSCRITTI - Le memorie possono essere redatte in italiano, in francese o in inglese e devono essere corredate di un riassunto in lingua italiana e in lingua inglese. Esse devono essere presentate nella forma definitiva e dattiloscritte. Il nome degli Autori citati nel testo deve essere seguito, fra parentesi, dall'anno in cui il lavoro citato è stato pubblicato. La bibliografia deve essere compilata sotto forma di lista in ordine alfabetico, attenendosi a questo schema: cognome dell'Autore citato, iniziale del nome, anno di pubblicazione del lavoro, titolo nella lingua originale, titolo del periodico, indicazione del volume, pagina in cui il lavoro inizia e pagina in cui termina.

Gli Autori sono responsabili del contenuto e dello stile delle loro memorie.

ILLUSTRAZIONI - Nel preparare le figure e le tavole destinate alla pubblicazione, gli Autori sono pregati di tener presenti le dimensioni della pagina stampata (mm 125×180).

ESTRATTI - Gli Autori ricevono gratuitamente 50 estratti; possono ottenerne un numero superiore a pagamento.

ABBONAMENTI - Il prezzo di abbonamento è di Lit. 4.800 al volume, comprese le spese postali.

Le memorie, gli abbonamenti e la corrispondenza relativa devono essere inviate al seguente indirizzo: Dr. Fernando Fabbri, Redazione di «Caryologia», Via Lamarmora, 4 - Firenze.

CARYOLOGIA, a periodical founded by **ALBERTO CHIARUGI**, is devoted to the publication of original research in plant and animal cytology, cytosystematics and genetics. One volume, of about 400-500 pages, is issued yearly and it consists of three numbers.

MANUSCRIPTS - Contributions in Italian, English and French are accepted; they should be typewritten and in complete and final form for publication. English and Italian summaries should complete the paper. The name of the Authors referred to in the Manuscript should be followed by the year, in parenthesis, in which the paper was published. The references should be arranged alphabetically and according to the following order: Author's surname, name initials, year of publication, original title of the work, journal name, volume number, inclusive pages.

Authors are responsible for the content and style of their contributions.

TABLES AND FIGURES - In preparing tables and figures for publication the size of the printed page, mm 125×180, should be kept in mind. The figure legends should be submitted on a separate page.

REPRINTS - The Authors will be furnished, free of charge, with 50 reprints. Additional reprints may be obtained at cost and the order should be written on the proofs.

SUBSCRIPTION RATE - Lit. 4,800 a year, postage included.

Papers, subscriptions, correspondence with reference to editorial matters should be addressed to the Associate Director, Dr. Fernando Fabbri, «Caryologia», Via Lamarmora, 4 - Firenze, Italy.

INDICE

NUTI RONCHI VITTORIA — Nuovi dati sull'attività mutagena dell'arancio di acridina in <i>Allium cepa</i> L.	pp. 193-203
CHHEDA H. R., J. M. J. DE WET and J. R. HARLAN — Aneuploidy in <i>Bothriochloa</i> hybrids	» 205-217
LOPRIENO NICOLA — Investigations on tomato anthracnose. I. The influence of carbohydrates on the growth of <i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) Hughes	» 219-229
ZAFFAGNINI FULVIO — Formazione di un <i>follicolo</i> ovarico e sua funzione nella genesi delle uova partenogenetiche in <i>Daphnia magna</i>	» 231-243
VERMA S. C. and SIRO KURITA — Cytology of <i>Dennstaedtia hirsuta</i> and its bearing on evolution in ferns	» 245-249
AVANZI SILVANA — Chromosome breakage by pyrrolizidine alkaloids and modification of the effect by cysteine	» 251-261
PAL SUNANDA and NIRANJAN PAL — Cytological investigations in <i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel. and <i>M. membranaceum</i> (Don.) Ching	» 263-269
BENAZZI LENTATI GIUSEPPINA — Considerazioni sul determinismo dei cicli cromosomici in ibridi di Planarie	» 271-277
SHARMA ARUN K. and U. C. BHATTACHARYYA — Cytological studies in <i>Begonia</i> . II.	» 279-301
BANCHETTI CHIARA — Lo sviluppo del gametofito femminile del <i>Senecio leucanthemifolius</i> Poir. var. <i>pinnatifidus</i> Fiori	» 303-311
FARUQI SHAMIM A. — Cytological studies in <i>Heliotropium</i> from West Pakistan	» 313-318
BERUTI ROSALIA — Lo sviluppo del gametofito femminile di <i>Hypochaeris aetnensis</i> L.	» 319-325
NOTIZIE	» 327-328